



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Hallazgos hematológicos y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Grecia Elena ALVAREZ MEDRANO

ASESOR

Mg. Luis Antonio HOYOS SIFUENTES

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Alvarez G. Hallazgos hematológicos y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

"Año de la Universalización de la Salud"



HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR:

- 0000-0002-1872-9356

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR:

- 0000-0003-4432-3904

DNI DEL AUTOR:

- 70552122

DNI DEL ASESOR:

- 41175479

GRUPO DE INVESTIGACIÓN

- Círculo Profesional de Investigación de Enfermedades Zoonóticas transmitidas por vectores del Perú (Zoovec), Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN

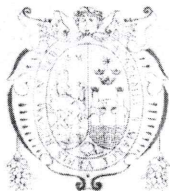
- Vicerrectorado de Investigación y Posgrado - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN, DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS

- Distrito de Chiclayo ubicada a la costa norte a 27 msnm con coordenadas geográficas entre los 06°46'19" de latitud sur y 79°50'21 de longitud oeste, (Lambayeque – Perú).
- Laboratorio de Patología Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con coordenadas geográficas 12°4'53.729" sur y 76°59'15.843 oeste, (Lima – Perú).

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ

- 2019



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 14 de noviembre de 2019**, a las **12:30** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0167-EPMV/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

Mg. Qf. Olga Mirtha Li Elías	Presidenta del Jurado
MV. Mg. Luis Antonio Hoyos Sifuentes	Asesor de la Tesis
MV. Esp. Viviana Rosa Fernández Paredes	Miembro del Jurado
MV. Mg. Luis Manuel Barrios Arpi	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ALVAREZ MEDRANO, GRECIA ELENA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Anaplasma* spp. EN PERROS CON ANTECEDENTES DE GARRAPATAS DEL DISTRITO DE CHICLAYO (LAMBAYEQUE – PERÚ)”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Olga Mirtha Li Elías Mg. Qf. Prof. Principal. D.E


Luis Antonio Hoyos Sifuentes MV. Mg. Prof. Asociado. D.E


Viviana Rosa Fernández Paredes MV. Esp. Prof. Asociado. T.C


Luis Manuel Barrios Arpi MV. Mg. Prof. Auxiliar T.C



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0167-EPMV/FMV-2019.

PRESIDENTE:


OLGA MIRTHA LI ELÍAS

MIEMBROS :



LUIS ANTONIO HOYOS SIFUENTES
ASESOR DE LA TESIS



VIVIANA ROSA FERNÁNDEZ PAREDES


BARRIOS ARPI LUIS MANUEL

San Borja, 08 de enero de 2020

Vº Bº


Dra. Daphne Ramos Delgado
Directora
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mis amados padres José Alvarez y Elena Medrano que desde tengo uso de razón me han brindado siempre su apoyo y amor incondicional en mis momentos buenos y malos de toda mi vida. Mis mejores ejemplos a seguir para ser mejor persona y ser feliz en esta vida.

A mis amigos cercanos (mi linda facultad, Casa gris, Came) por mostrarme su verdadera amistad y mejores deseos, su apoyo y aliento para cumplir con este objetivo que me abrirá paso a muchas metas trazadas por realizar y me ayudará a crecer profesionalmente.

A mi mentor, asesor y amigo Luis Hoyos por su confianza en todo momento por terminar este trabajo, por escucharme y darme sabios consejos de la vida en mis altibajos para seguir adelante.

A mis hijos “pequeños angelitos de cuatro patas” (Bobby, Valentín, Roma, Ares, Marcelo, Leo... Simba, Scot” que son una parte importante en mi vida del porqué elegí esta hermosa y apasionante carrera.

AGRADECIMIENTOS

A mi linda casa de estudios Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por ser el escenario principal de todas mis mejores vivencias.

Agradezco infinitamente a mi asesor de tesis Mg. MV. Luis Hoyos por cultivarnos a cada uno de nosotros, sus pupilos, el amor y dedicación por la investigación.

A la Dra. Olga Li, Carlitos, sra. Blanca y los prometedores nuevos miembros del Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria por todo el apoyo y ese lindo ambiente de trabajo y compañerismo tanto adentro como afuera. Mi gran admiración, respeto y estima a ellos.

Al grupo ZOOVEC donde empezó esta pasión, recorrido y amistad. Mis colegas y compañeros Miguel Cervantes, Leyla Ramires, Deysi Masgo, Yamili Mendoza, Raúl Enriquez y Fernanda Valenzuela por esos viajes y bellos momentos con muchas anécdotas y situaciones locas que nunca olvidaré.

A los MV. Jesús Oliva e Ytalia Torres por las instalaciones de la veterinaria “Más que patas” y apoyo superincondicional y a su familia. A la Dra. Nilet Mas Guevara por el apoyo mediante su laboratorio “Pet Lab” e instalaciones en coordinación con la clínica veterinaria “Happy pet Chiclayo”.

Al albergue “Refugio animal Chiclayo” por esa linda y noble labor que hacen al ayudar y dar una nueva oportunidad a estos nobles e indefensos animalitos.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ANAPLASMOSIS CANINA.....	4
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	4
2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	5
2.2.2. MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES	7
2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.3.1. VECTOR.....	8
2.3.2. HOSPEDEROS Y RESERVORIOS.....	11
2.3.3. TRANSMISIÓN.....	12
2.3.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA	13
2.3.5. COINFECCIÓN Y COINFECCIONES MÚLTIPLES.....	17
2.4. PATOGÉNESIS	20
2.5. SIGNOS CLÍNICOS	22
2.6. DIAGNÓSTICO.....	25
2.6.1. HEMOGRAMA.....	25
2.6.2. CITOLOGÍA	26
2.6.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	28
2.6.4. ULTRASONOGRAFÍA.....	29
2.6.5. PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	29
2.6.6. PRUEBAS MOLECULARES (PCR).....	32
2.7. TRATAMIENTO	33
2.8. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	35
2.9. ZOONOSIS.....	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	40

3.1. LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	40
3.2 MATERIALES	40
3.2.1. INDIVIDUOS PARTICIPANTES	40
3.2.2 MATERIALES PARA TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS OBTENIDAS	41
3.2.3. MATERIALES PARA PRUEBAS HEMATOLÓGICAS Y SEROLÓGICAS	42
3.3. MÉTODOS	43
3.3.1. TOMA DE MUESTRAS	43
3.3.2. ANÁLISIS HEMATOLÓGICO.....	44
3.3.3. VISUALIZACIÓN DE CORPÚSCULOS DE INCLUSIÓN (CI) O MÓRULAS	46
3.3.4. ANÁLISIS SEROLÓGICO	47
3.4. ANÁLISIS DE DATOS	47
IV. RESULTADOS.....	48
V. DISCUSIÓN.....	53
VI. CONCLUSIONES	61
VII. RECOMENDACIONES	62
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	63
IX. APÉNDICE.....	79

RESUMEN

La Anaplasmosis canina es una enfermedad rickettsial zoonótica causada por bacterias intracelulares obligatorias gram negativas siendo *Anaplasma phagocytophilum*, responsable de la Anaplasmosis Granulocítica Canina (AGC) y *Anaplasma platys* causante de la Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) y que son transmitidos por la mordedura de garrapatas *Ixodes* spp. y *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente. En nuestro país existen pocos reportes de estos agentes en perros, más sí hay evidencia de la garrapata vector. El objetivo de este estudio fue determinar Anaplasmosis canina mediante el hallazgo hematológico (evidencia de corpúsculos de inclusión o mórulas más trombocitopenia) y presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú). Para ello se colectaron 88 muestras sanguíneas de perros aparentemente sanos y con antecedentes de mordeduras por garrapatas. El hallazgo hematológico evidenció que el 2.27% (2/88) de perros fueron positivos (presentaron corpúsculos de inclusión o mórulas más trombocitopenia) resultando ser compatibles con *A. platys*. Además, se detectó una seropositividad a *Anaplasma* spp. en un 22.73% (20/88) y una seropositividad múltiple del 21.59% (19/88) con *Ehrlichia* spp. mediante el Test SNAP® 4Dx® Plus. Por otro lado, los perros positivos y seropositivos evidenciaron de mayor a menor frecuencia alteraciones hematológicas como trombocitopenia, anemia, leucocitosis y leucopenia. Estos resultados demuestran Anaplasmosis canina de tipo subclínico en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú).

Palabras clave: *A. phagocytophilum*, *A. platys*, corpúsculos de inclusión (CI), mórula, trombocitopenia, anticuerpos

ABSTRACT

Canine Anaplasmosis is a zoonotic rickettsial disease caused by obligatory gram-negative intracellular bacteria, *Anaplasma phagocytophilum*, responsible for Canine Granulocytic Anaplasmosis (CGA) and *Anaplasma platys* causing Infectious Canine Cyclic Thrombocytopenia (ICCT) and they are transmitted by the bite of ticks *Ixodes* spp. and *Rhipicephalus sanguineus*, respectively. In our country there are few reports of these agents in dogs, but there is evidence of the vector tick. The objective of this study was to determine canine Anaplasmosis by the hematological finding (evidence of inclusion corpuscles or morulas plus thrombocytopenia) and presence of antibodies against *Anaplasma* spp. in dogs with a history of ticks from the Chiclayo district (Lambayeque - Peru). For this, 88 blood samples were collected from apparently healthy dogs with a history of tick bites. The hematological finding evidenced that 2.27% (2/88) of dogs were positive (they presented inclusion corpuscles or morulas plus thrombocytopenia) proving to be compatible with *A. platys*. In addition, seropositivity to *Anaplasma* spp. in 22.73% (20/88) and a multiple seropositivity of 21.59% (19/88) with *Ehrlichia* spp. using the SNAP[®] 4Dx[®] Plus Test. On the other hand, positive and seropositive dogs showed greater and less frequent hematological abnormalities such as thrombocytopenia, anemia, leukocytosis and leukopenia. These results demonstrate canine Anaplasmosis of the subclinical type in dogs with a history of ticks from the Chiclayo district (Lambayeque - Peru).

Key Words: *A. phagocytophilum*, *A. platys*, inclusion corpuscles, morulae, thrombocytopenia, antibodies

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Alteraciones hematológicas halladas en los 20 perros seropositivos con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)	51
Cuadro 2. Frecuencia de seropositividad única y múltiple mediante el Test SNAP® 4Dx® Plus de 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque – Perú)	52
Cuadro 3. Resumen general de los hallazgos hematológicos y serológicos de 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Frotis sanguíneos con mórulas al interior de plaquetas circulantes compatibles con <i>A. platys</i> (1a, 1b y 1c). Tinción Wright (1000x)	50
Figura 2. Frotis sanguíneo con dos mórulas al interior del linfocito compatibles con <i>Ehrlichia canis</i> . Tinción Wright (1000x)	50
Figura 3. Seropositividad a <i>Anaplasma</i> spp. y <i>Ehrlichia</i> spp. usando el Test SNAP [®] 4Dx [®] Plus	51

I. INTRODUCCIÓN

La Anaplasmosis canina es una enfermedad emergente causada por *Anaplasma phagocytophilum* siendo responsable de la Anaplasmosis Granulocítica Canina (AGC) (Dumler *et al.*, 2001) y *A. Platys* causando la Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) (Harvey *et al.*, 1978). Estos agentes son transmitidos por la mordedura de garrapatas *Ixodes* spp. y *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente (Sainz *et al.*, 2015).

En el norte del Perú, la existencia de garrapatas *Ixodes* spp. y *Rhipicephalus sanguineus* (Glenny *et al.*, 2004; Oliva, 2015; Cervantes, 2018) representa una gran problemática porque cumplen un rol fundamental en la transmisión de la enfermedad; además, la alteración de los ecosistemas por el cambio climático global contribuye al aumento y distribución de dichos invertebrados a diferentes áreas geográficas propagando a los agentes infecciosos a áreas libres de la enfermedad.

El aumento del transporte internacional de animales de compañía, la existencia de albergues caninos que promueven el hacinamiento, mayor crianza con otras especies de animales donde puedan intercambiar géneros de garrapatas, el estrecho contacto del humano con los perros, resistencia de los productos para el control de las garrapatas, coinfecciones con otros agentes agudizan la enfermedad haciendo que el diagnóstico y la gestión de las enfermedades transmitidas por garrapatas se vuelva médicamente más compleja y más desafiante (Brown *et al.*, 2006; Qurollo *et al.*, 2014).

La Anaplasmosis canina generalmente se presenta de manera subclínica (Carvalho *et al.*, 2017; Contreras *et al.*, 2018) evidenciando solo hallazgos hematológicos, como también, puede manifestar signos clínicos como anorexia, fiebre, letargo, mucosas pálidas, hemorragia, esplenomegalia y hepatomegalia a la palpación, poliartritis y en raros casos signos neurológicos (Tateishi *et al.*, 2015; Bouzouraa *et al.*, 2016; Chirek *et al.*, 2018).

En los hallazgos hematológicos se pueden encontrar corpúsculos de inclusión (CI) o mórulas que infectan granulocitos como neutrófilos y eosinófilos (*A. phagocytophilum*) y plaquetas (*A. Platys*) acompañadas de alteraciones hematológicas (principalmente trombocitopenia, anemia y leucopenia) (Bouzouraa *et al.*, 2016; Chirek *et al.*, 2018).

Existe coinfecciones múltiples con patógenos como *Ehrlichia canis*, *B. burgdorferi*, *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., entre otros, agudizando los signos clínicos; en consecuencia, una recuperación tardía frente al tratamiento y en otros casos, enmascarando la verdadera causa subdiagnosticando la enfermedad al elegir el tratamiento equivocado (Gaunt *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2011; Oliva, 2015; Sainz *et al.*, 2015; Naranjo, 2018).

El diagnóstico se realiza mediante los hallazgos hematológicos y serológicos basándose en la anamnesis e historial clínico para brindar un diagnóstico certero e instaurar el tratamiento (Sainz *et al.*, 2015). Generalmente el pronóstico es bueno si es detectado a tiempo (Yancey *et al.*, 2017).

En nuestro país la información reportada para la Anaplasmosis canina es escasa. Existen estudios serológicos con resultados seropositivos frente a *Anaplasma* spp. reportados en Lima, Lambayeque y Piura, incluso con detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* y *Ehrlichia* spp. (Rubio *et al.*, 2011; Delgado y Montoya, 2018; Naranjo, 2018), además del primer estudio hematológico y molecular reportado en Lima Metropolitana donde identificaron *A. platys* (Tateishi *et al.*, 2015).

La importancia de la Anaplasmosis canina radica en que al ser una enfermedad emergente y zoonótica (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014; Breitschewerdt *et al.*, 2014; CDC, 2019); actualmente es subdiagnosticada en las consultas diarias, debido a que no presenta signos patognomónicos e incluso puede presentarse en un animal aparentemente sano y solo presentar alteraciones hematológicas. El uso aún de pruebas serológicas rápidas contra un solo agente (ejemplo *Ehrlichia* spp.), limita a la verdadera posible causa al no considerar *Anaplasma* spp.

El presente estudio pretende mostrar el panorama actual de la Anaplasmosis en perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque – Perú) mediante los hallazgos hematológicos (hemograma más visualización directa de mórulas o corpúsculos de inclusión) y serológico (Test SNAP® 4Dx® Plus) mediante técnicas accesibles, rápidas y fáciles de realizar en la clínica veterinaria cuyos resultados representan un gran impacto en la Salud Pública y Animal ya que los perros suelen ser centinelas para la exposición

humana (Qurollo *et al.*, 2014; Weinborn *et al.*, 2018) debido al gran contacto y apego que actualmente representan; además, de actuar como reservorios para *Anaplasma* spp. (Sainz *et al.*, 2015).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANAPLASMOSIS CANINA

La Anaplasmosis canina es una enfermedad infecciosa producida principalmente por dos bacterias pertenecientes al género *Anaplasma* spp. que tienen una afinidad determinada para infectar distintas células sanguíneas según el agente involucrado. Éstas se transmiten y propagan mediante vectores, siendo un papel fundamental, la mordedura de diferentes géneros de garrapatas (Dumler *et al.*, 2001; Sainz *et al.*, 2015).

Los perros infectados por estos patógenos pueden desarrollar diferentes cuadros de la enfermedad que van desde una infección subclínica hasta una enfermedad potencialmente mortal caracterizada por fiebre, letargo, anorexia y, en algunos casos, diátesis hemorrágica (Eberts *et al.*, 2011; Bouzouraa *et al.*, 2016). La disminución del recuento de plaquetas se considera la alteración hematológica más común durante la infección en perros, lo que representa con frecuencia el único hallazgo en animales aparentemente sanos (Gaunt *et al.*, 2010; Eberts *et al.*, 2011; Bouzouraa *et al.*, 2016; Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

La Anaplasmosis canina es una enfermedad causada por dos bacterias intracelulares obligadas gram-negativas *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* que son transmitidas mediante la mordedura de garrapatas infectando células polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos) y plaquetas, respectivamente. La infección puede abarcar a diferentes mamíferos incluyendo al hombre (Sainz *et al.*, 2015).

En 1982, California (EE.UU), fue identificado por primera vez en perros *Anaplasma phagocytophilum* (denominada antes *Ehrlichia phagocytophila*) (Madewell y Gribble, 1982), aunque ya había sido conocido como agente veterinario desde el año 1932, pero solo se había reconocido como un patógeno humano en EE.UU por Bakken *et al.* (1994) además de ser descritas en otras especies domésticas (ovino, caprino, bovino y equino) denominándose con otros nombres diferentes a la actual (Gordon *et al.*, 1940). Esta bacteria infecta a los granulocitos (neutrófilos y rara vez en eosinófilos) en una gran variedad de especies, incluidos perros, gatos, caballos, rumiantes y humanos. Es el agente causal de la fiebre transmitida por garrapatas de los rumiantes, así como la anaplasmosis granulocítica equina, la anaplasmosis granulocítica canina y la anaplasmosis granulocítica humana (Dumler *et al.*, 2001; CDC, 2019).

En 1978, Florida (EE.UU), en perros con signos clínicos compatibles a Erliquiosis, se identificaron por primera vez corpúsculos de inclusión que solo afectaba a las plaquetas. El agente responsable fue *Anaplasma platys* (denominada antes *Ehrlichia platys*) causante del síndrome clínico conocido como Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) (Harvey *et al.*, 1978) donde hasta la actualidad se ha reportado en sangre periférica de diversos mamíferos incluyendo al hombre (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015).

2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Pertenecen al Dominio Bacteria, Filo Proteobacteria, Clase Alphaproteobacteria, Orden *Rickettsiales*, Familia *Anaplasmataceae* y género *Anaplasma*.

Súper Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: *Rickettsiales*

Familia: *Anaplasmataceae*

Género: *Anaplasma*

Especie:

A. Platys

A. phagocytophilum

A inicios del siglo XXI, Dumler *et al.* (2001) realizaron una nueva reorganización en la clasificación taxonómica de los microorganismos del Orden *Rickettsiales* donde se establecieron dos familias: *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*. Se señaló que la familia *Rickettsiaceae* está

compuesta por los géneros *Rickettsia* spp. y *Orientia* spp.; dichos géneros contienen diversas especies patógenas de gran importancia debido a su impacto en la salud pública a nivel mundial. La familia *Anaplasmataceae* ha sido ampliada para incluir en ella a todas las especies que estén contenidas en los géneros de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Cowdria* spp., *Wolbachia* spp. y *Neorickettsia* spp. Dicha reclasificación ha sido en base a los datos obtenidos en el secuenciamiento del gen *16S ARNr*.

Una diferencia biológica entre ambas familias consiste en que las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* se multiplican dentro de vacuolas rodeadas de membranas mientras que los miembros de la familia *Rickettsiaceae* lo hacen libres en el citoplasma de la célula huésped (Greene, 2012).

Para obtener una reorganización precisa establecieron una clasificación de las especies contenidas en los géneros de la Familia *Anaplasmataceae* en cuatro genogrupos (Dumler *et al.*, 2001):

- 1) **Genogrupo Ehrlichia:** *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia muris* y *Cowdria ruminantium*.
- 2) **Genogrupo Anaplasma:** *Anaplasma phagocytophilum* (*E. phagocytophila*, *E. equi*, Agente de la HGE), *Anaplasma (Ehrlichia) bovis*, *Anaplasma (Ehrlichia) ovis*, *Anaplasma (Ehrlichia) platys*, *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*.
- 3) **Genogrupo Neorickettsia:** *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu*, *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* y *Neorickettsia helminthoeca*.
- 4) **Genogrupo Wolbachia:** *Wolbachia pipientis*.

Esto permitió ampliar el género *Anaplasma*, que hasta entonces contenía patógenos específicos de distintos hospedadores rumiantes (*A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*), para dar cabida en él a *A. phagocytophilum*, especie resultante de la unificación de tres microorganismos anteriormente clasificados como *Ehrlichia* (*E. equi*, *E. phagocytophila* y el agente innominado de la Erliquiosis Granulocítica Humana). También se incluyeron en el género *Anaplasma* las especies *A. bovis* (anteriormente *E. bovis*), *A. platys* (anteriormente *E. platys*), y una nueva especie *A. capra* (Dumler *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015).

2.2.2. MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES

Las rickettsias de la familia *Anaplasmataceae* son microorganismos gramnegativos, no móviles, coccoides a elipsoides, a menudo pleomórficos, que varían en tamaño de 0,2 a 2,0 μm de diámetro. Son aerobios obligados que carecen de una vía glucolítica, y todos son parásitos intracelulares obligados. A diferencia de otras bacterias gramnegativas, los miembros de la familia *Anaplasmataceae* carecen de pared celular y son extremadamente sensibles al estrés mecánico, como sonicación, congelación y descongelación, y cambios en la osmolaridad. Están envueltos con una membrana externa delgada y rizada que carece de engrosamiento de la lámina interna y externa y no muestra signos de una capa de peptidoglicano o LPS (Greene, 2012).

A falta de genes para la biosíntesis del lípido A y la mayoría de los genes para la biosíntesis de peptidoglicano explica la naturaleza pleomórfica de estas bacterias (Lin y Rikihisa, 2003). El LPS y el peptidoglicano, que son compartidos por muchos grupos de bacterias, provocan respuestas inmunes innatas profundas en los huéspedes. Esta eliminación de genes para la biosíntesis de LPS y peptidoglicano en estas bacterias probablemente aumenta su probabilidad de supervivencia tanto en huéspedes vertebrados como invertebrados (Hotopp *et al.*, 2006).

Todas las especies del género *Anaplasma* habitan en vacuolas derivadas de la membrana celular en células hematopoyéticas inmaduras o maduras de huéspedes mamíferos (Greene, 2012).

A. phagocytophilum infecta preferentemente células del linaje mieloide de la médula ósea, predominantemente neutrófilos, aunque en raras ocasiones, se han encontrado organismos en los eosinófilos. Es una bacteria gramnegativa pleomórfica alfa que mide 0,4 a 2 μm de tamaño cuya membrana externa es a menudo gruesa con espacios periplásmicos irregulares sin cápsula (Rikihisa *et al.*, 1997; Popov *et al.*, 1998). Se observan dos morfologías ultraestructurales: una pequeña forma de núcleo denso con protoplasma condensado, de 0,2 a 0,4 μm de tamaño (también llamado cuerpo elemental); y una forma reticular más grande, de 0,8 a 2,0 μm (también llamada cuerpo reticular) (Dumler *et al.*, 2001). Ambas formas están presentes en la misma vacuola y pueden experimentar una solución binaria igual o desigual. La replicación en el interior de las vacuolas produce 20 o más organismos, formando la clásica "mórula" (del latín *morum*: "mora"), una estructura basófila detectable por microscopía óptica en sangre o fluido sinovial centrifugado. En las células de mamíferos, las mórulas suelen tener un diámetro de 1.5 a 2.5 μm , pero pueden ser tan grandes como 6 μm . Mediante microscopía óptica, las mórulas de *A. phagocytophilum* son indistinguibles de las mórulas de *E. ewingii* (Greene, 2012).

El genoma de *A. phagocytophilum* se basa en un solo cromosoma circular con 1,47 megabases (Mb), 1369 marcos de lectura abiertos y 458 proteínas hipotéticas. También hay múltiples secuencias repetidas, asociadas con numerosas funciones importantes como la expansión de las proteínas de la membrana externa de la familia msp2 / p44, el sistema de secreción de tipo IV y la biosíntesis de la vitamina / cofactor (Greene, 2012).

Ultraestructuralmente, *A. platys* varía de 0,35 a 1,55µm de diámetro; tienen forma redonda, ovalada o de frijol; y están rodeados por una doble membrana plasmática. Las plaquetas infectadas pueden contener de una a tres vacuolas revestidas con una sola membrana con 1 a 15 organismos por vacuola. Los organismos parecen entrar en las plaquetas al adherirse a la superficie de las plaquetas y luego a la endocitosis. Por lo tanto, la membrana vacuolar probablemente se deriva de la membrana plaquetaria externa. La fusión repetida de organismos dentro de la vacuola da lugar a la formación de una mórula (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003).

En la fase inicial, *A. platys* es representada como corpúsculos pequeños revestidos por una membrana engrosada; durante en el estadio intermedio del desarrollo de la bacteria se da la condensación del ADN sobre la zona central del organismo; y finalmente en el estadio maduro, los corpúsculos se caracterizan por presentar fibrillas de ADN en el área central, y en la periferia se muestra una sustancia granular compuesta principalmente por ribosomas. Esta bacteria puede ser observada dentro de la plaqueta mediante microscopía electrónica de transmisión (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003).

2.3.EPIDEMIOLOGÍA

2.3.1. VECTOR

El principal vector para la transmisión de *A. phagocytophilum* son las garrapatas del género *Ixodes* spp. En Eurasia, *Ixodes ricinus* es el principal vector de *A. phagocytophilum* teniendo una amplia distribución en estos últimos años en todo Europa; aunque en las regiones orientales de Europa, *I. ricinus* se reemplaza por *I. persulcatus*, una especie estrechamente relacionada cuyos hábitats se extienden hacia el este y hacia Japón. Otras garrapatas son vectores importantes en varias regiones. En EE.UU se distribuye diferentes especies como *Ixodes scapularis* donde se encuentra en el noreste y medio oeste superior, e *Ixodes pacificus* en los estados occidentales (Greene, 2012).

También se ha evidenciado molecularmente *A. phagocytophilum* en otros géneros de garrapatas como *Haemaphysalis longicornis* (larvas, ninfas y adultos) e *Ixodes persulcatus* recolectadas de pequeños mamíferos silvestres y el medio ambiente en Corea (Kim *et al.*, 2003). En España central, se halló ADN de *A. phagocytophilum* en otras especies de garrapatas como *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* e *Hyalomma m. marginatum* en jabalíes y ciervos rojos (De la fuente *et al.*, 2004). Estudios similares se halló en Camargue, Francia, ADN de *A. phagocytophilum* en garrapatas *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Dermacentor marginatus* e *Hyalomma marginatum* que se habían alimentado de caballos y complementando el estudio filogenético se descubrió que este *A. phagocytophilum* eran genotipos que infectaban a caballos y humanos en EE.UU (Chastagner *et al.*, 2013). En Brasil, *A. phagocytophilum* se evidenció en *R. sanguineus* y *Amblyomma cajennense* recolectados de perros cuyas cepas eran muy similares a las halladas en aves silvestres de la zona y cepas patógenas en humanos (Santos *et al.*, 2013).

En Italia, Silicia, Torina *et al.* (2013) realizaron un estudio molecular para detectar *Anaplasma* spp. y otros agentes en zorros y en sus pulgas evidenciando *A. phagocytophilum* en la pulga *Xenopsylla cheopis* (pulga tropical de las ratas). Este trabajo demostró que la pulga era el ectoparásito más frecuente en este mamífero; sin embargo, no se halló la bacteria en los zorros.

El vector probable de *A. platys* son las garrapatas del grupo *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus* sensu lato) (Dantas-Torres *et al.*, 2013; De Tommasi *et al.*, 2014) aunque experimentalmente no se ha logrado la transmisión (Simpson *et al.*, 1991). Sin embargo, mediante pruebas moleculares se ha detectado ADN de *A. platys* en garrapatas de *R. sanguineus*, lo que sugiere que éstas actúan como un vector potencial para *A. platys* (Santos *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2014). Las altas tasas de coinfección con *E. canis* reportadas a nivel mundial apoyan esta teoría (Foongladda *et al.*, 2011) debido a la presencia mediante pruebas moleculares en perros (Almazán *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017) y otros cánidos salvajes como zorros rojos que han tenido en común la infestación por *R. sanguineus* (Cardoso *et al.*, 2015). El papel de *Rhipicephalus* sp. como vector de *A. platys* necesita ser confirmado mediante la visualización de esta bacteria en las glándulas salivales de la garrapata y por la demostración de su transmisión de garrapatas infectadas a los perros (Ramos *et al.*, 2014).

Además del *Rhipicephalus sanguineus*, también se ha detectado molecularmente *A. platys* en las ninfas del *Dermacentor auratus* recolectadas en perros de Tailandia (Parola *et al.*, 2003), evidenciando que otras garrapatas estarían implicadas en la transmisión.

A. platys ha sido detectado molecularmente en otros invertebrados como el piojo masticador del perro *Heterodoxus spiniger* que infestaban a cachorros caninos en Australia (Brown *et al.*, 2005). Aunque la presencia de este agente en este invertebrado no es determinante para declarar como posible vector ya que en este estudio no realizaron la detección de la bacteria en los cachorros quedando con la incertidumbre de que el hallazgo molecular se deba a la reciente alimentación de estos caninos que probablemente hallan estado infectados por *A. platys*.

En cuanto a la prevalencia de ectoparásitos en caninos realizados en América, tenemos *Rhipicephalus sanguineus* encontramos 23% en Argentina (Perez, 2008); 44.97%, Uruguay (Carballal y Galliazzi, 2015) y 98.63% en Venezuela (Quijada *et al.*, 2013). Además, en este último estudio según Quijada *et al.* (2013) hallaron otro género de garrapata identificado como *Amblyomma ovale* (1.03%) y *A. tigrinum* (0.34%). En cuanto a reportes de las garrapatas presentes en perros tenemos en Brasil donde se identificó *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* y *Amblyomma* sp. (Santos *et al.*, 2013); México, *Rhipicephalus sanguineus* (Almazán *et al.*, 2016) y en Chile se ha reportado principalmente *Rhipicephalus sanguineus* y en muy poca frecuencia *Amblyomma tigrinum* y *Amblyomma triste* (Abarca *et al.*, 2016).

En nuestro país la presencia de garrapatas *Ixodes* spp. ha sido reportado en animales silvestres (Dale, 1977), cuya identificación de la especie, resultaron ser diferentes a las implicadas en la transmisión de Anaplasmosis canina en comparación a otros países. Años posteriores, Glenney *et al.* (2004) realizaron un estudio hallando una frecuencia de infestación del 87.5% con *Ixodes* sp., además de 66.6% con *A. maculatum* en perros provenientes de Piura y Amazonas, encontrándose *R. sanguineus* en un solo en un solo hospedador. Se desconoce las especies de garrapatas *Ixodes* involucradas en nuestro medio.

Existen diversos estudios de prevalencia de ectoparásitos en perros realizados en nuestro país. En diferentes distritos de Lima se halló *Rhipicephalus sanguineus* con una prevalencia de 3 a 30% en perros con respecto a otros ectoparásitos (Liberato, 1998; Bustamante, 1998; Estares, 1999; Córdova, 2016); mientras que, en Tumbes, se encontró una prevalencia del 92.5% para *Rhipicephalus sanguineus* (Nunton *et al.*, 2013). Por otro lado, en Trujillo, tuvieron una prevalencia del 100% para *Rhipicephalus sanguineus* (Huamán y Jara, 2017). En Cusco, ya existía evidencia de *Rhipicephalus sanguineus* en perros (Escalante, 1981).

Durante un trabajo de investigación de Erliquiosis canina en la ciudad de Chiclayo (Lambayeque - Perú), se halló en uno de los canes, una garrapata del género *Amblyomma* spp.

mediante la identificación morfológica y las demás fueron identificadas como *R. sanguineus* (Oliva, 2015). Según Dale (1977), en su recopilación de distintos trabajos anteriores de ectoparásitos en animales domésticos y silvestres ya existía evidencia de *A. americanum* siendo el perro un posible hospedero. Este género de garrapata es el principal vector de *E. ewingii* y al igual que *A. phagocytophilum* infecta células granulocíticas (Greene, 2012). Un estudio reciente en el distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú) halló morfológica y molecularmente una prevalencia del 100% *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato a partir de garrapatas colectadas de perros con signos compatibles con Erliquiosis canina y mediante el análisis filogenético las secuencias fueron clasificadas dentro del Linaje del Norte, la cual este linaje a diferencia del Sur, son conocidos por ser vectores competentes de *E. canis* (Cervantes, 2018). Esto confirma que es la garrapata más importante en esta ciudad.

Los estudios moleculares de *A. phagocytophilum* y *A. platys* causantes de la anaplasmosis canina halladas en diferentes garrapatas e incluso en otros invertebrados que infestan a caninos es alarmante, ya que en nuestro país habitan estos vectores haciéndolos muy susceptible a la infección por estos agentes. Son muy pocas las investigaciones realizadas en los vectores tanto en su identificación morfológica y molecular como la presencia del agente en el vector y sus hospederos para tener un panorama actual de la Anaplasmosis canina en el Perú.

La vigilancia espacio-temporal de patógenos transmitidos por garrapatas debe identificar áreas de alto riesgo para la exposición a patógenos transmitidos por vectores, facilitar el diagnóstico de patógenos desatendidos regionalmente y dilucidar mejor los riesgos de coinfección (Qurollo *et al.*, 2014).

2.3.2. HOSPEDEROS Y RESERVORIOS

A. phagocytophilum y *A. platys*, además de tener como hospederos a los perros causando la anaplasmosis canina, infectan a diversos mamíferos domésticos y silvestres incluyendo al hombre con manifestación de cuadros subagudos, agudos y crónicos (Greene, 2012). El ciclo biológico de estos agentes se conserva en el medio ambiente por garrapatas y reservorios vertebrados (Dumler *et al.*, 2001).

A. phagocytophilum se mantienen en la naturaleza en un ciclo biológico garrapata-mamífero-garrapata. Estos mamíferos suelen ser reservorios naturales como roedores (ratones, ratas y ardillas) y cérvidos (Greene, 2012).

A. phagocytophilum tiene una mayor afinidad por los neutrófilos de perros, caballos y humanos (Dumler *et al.*, 2005); no obstante, puede infectar a otros mamíferos domésticos y silvestres (Dahmani *et al.*, 2015).

Nuevas evidencias de pruebas moleculares consideran a las aves migratorias como posibles reservorios por ser infestadas principalmente por larvas *I. ricinus* donde muestran la presencia de *A. phagocytophilum* en las aves como en sus garrapatas, jugando un papel importante en la propagación y distribución de este agente (Palomar, 2017).

Los perros son los principales reservorios de *A. platys* (Gaunt *et al.*, 2010), pero también se han reportado infecciones naturales en otros carnívoros como gatos (Zobba *et al.*, 2015), zorros (Cardoso *et al.*, 2015); rumiantes domésticos y silvestres como ciervos, jabalíes, vacas, cabra, oveja, camellos y búfalos (Greene, 2012; Nelson y Couto, 2014).

Se ha detectado en humanos corpúsculos de inclusión en plaquetas compatibles con *A. platys* (Arraga-Alvarado *et al.*, 2003) y mediante pruebas moleculares como el PCR (Maggi *et al.*, 2013; Breitschwerdt *et al.*, 2014).

El perro es un reservorio potencial de la anaplasmosis actuando como centinelas para la exposición humana e incluso de otras infecciones zoonóticas transmitidas por la mordedura de garrapatas (Huang *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2008; Qurollo *et al.*, 2014; Breitschwerdt *et al.*, 2014).

2.3.3. TRANSMISIÓN

La transmisión principal es de forma biológica en donde *Anaplasma* sp. requiere de un vector para el mantenimiento de la infección y transmisión a partir del huésped infectado a otro nuevo mediante la mordedura de las garrapatas. Los vectores implicados en la Anaplasmosis canina son las garrapatas *Ixodes* spp. y *Rhipicephalus sanguineus* para *A. phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, respectivamente (Greene, 2012).

Los tiempos de transmisión para *A. phagocytophilum*, desde la adherencia de la garrapata, se produce dentro de las primeras 24 a 48 horas (Dinitz y Breitschwerdt, 2012), aunque para *A. platys* se desconoce.

Aún no se ha destrito una transmisión transovárica en *Ixodes* spp. para *A. phagocytophilum*, pero sí en *Dermacentor albipictus* en los EE.UU. Sin embargo, bajo condiciones experimentales, las larvas F1 infectadas que se criaron hasta la madurez no pudieron transmitir las bacterias a su progenie (Baldrige *et al.*, 2009).

Se sugiere la transmisión transtadial para *A. platys* en *R. sanguineus* al identificarse molecularmente este agente en garrapatas adultas y ninfas recolectadas de perros negativos indicando que pudieron adquirir la bacteria en la etapa de vida anterior (Ramos *et al.*, 2014).

En humanos se ha evidenciado la transmisión perinatal por *A. phagocytophilum* en un infante a los 9 días de nacido (Dhand *et al.*, 2007); sin embargo, en un estudio de una perra infectada antes del parto no pudo demostrar esta hipótesis en sus cachorros recién nacidos (Plier *et al.*, 2009). Mientras que en otros mamíferos se ha reportado transmisión transplacentaria de *A. phagocytophilum* en infecciones experimentales en una oveja y una vaca con signos clínicos compatibles a los 13 días de nacido (Pusterla *et al.*, 1997).

Una investigación realizada en Italia sugiere la transmisión vertical para *A. platys* al hallarse mediante pruebas moleculares en el aparato reproductor y fetos en perras preñadas durante la primera fase de gestación (Latrofa *et al.*, 2016), aunque no se demostró la presencia en sangre en recién nacidos por ser gestaciones interrumpidas. En Kenia, un estudio reafirma la transmisión vertical de forma transplacentaria al hallarse molecularmente *A. platys* en cachorros (menores a 28 días) donde la madre y cachorros no evidenciaron infestaciones por garrapatas durante ese tiempo (Matei *et al.*, 2017).

También se ha informado la transmisión a través de hemoderivados contaminados o la exposición directa involuntaria a tejidos infectados de vertebrados o vectores (Abarca *et al.*, 2008; Little, 2010; Nicholson *et al.*, 2010; Khatat *et al.*, 2016).

2.3.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA

La Anaplasmosis canina, causada por *A. phagocytophilum* y *A. platys*, es una enfermedad con una amplia distribución mundial. Frecuentemente aparece en regiones tropicales y subtropicales cuyos climas favorecen el ciclo biológico de las garrapatas; no obstante, en climas templados suele ser esporádico y su distribución va en aumento por la alteración de los ecosistemas debido al calentamiento global (Sainz *et al.*, 2015).

La presencia de *Anaplasma* spp. en caninos se ha reportado mediante pruebas hematológicas y visualización de las mórulas o corpúsculos de inclusión en sus células dianas y mediante pruebas moleculares (PCR); además, de la presencia de anticuerpos mediante IFA y ELISA (Greene, 2012; Nelson y Couto, 2014).

La presencia de Anaplasmosis canina (mediante pruebas hematológicas, serológicas y moleculares) en referencia a *A. phagocytophilum* responsable de la Anaplasmosis granulocítica canina se ha reportado en Europa: Austria, Albania, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Letonia, Polonia, Portugal, Rumanía, Rusia, Suecia, Suiza, España, Reino Unido; en América: Canadá, EE.UU, Caribe, Brasil, Colombia, Chile, Perú (Macieira *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2008; Eberts *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2011; Berzina *et al.*, 2014; Quorllo *et al.*, 2014; McCown *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015).

Mediante pruebas moleculares, *A. platys* se ha reportado en Europa, países tales como Grecia (Kontos *et al.*, 1991), España (Bouzouraa *et al.*, 2016), Francia (Beaufils *et al.*, 2002), Croacia (Dyachenko *et al.*, 2012), Italia (De Tommasi *et al.*, 2014; Latrofa *et al.*, 2016; Bouzouraa *et al.*, 2016), Portugal (Bouzouraa *et al.*, 2016); en Asia, países como Taiwán (Chang *et al.*, 1996), China (Hua *et al.*, 2000), (Suksawat *et al.*, 2001; Pinyoowong *et al.*, 2008), Japón (Inokuma *et al.*, 2002), Tailandia y Turquía (Ulutas *et al.*, 2007); en África como Kenia (Matei *et al.*, 2017); en América, países como EE.UU (French y Harvey, 1983), Venezuela (Suksawat *et al.*, 2001; Arraga-Alvarado *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005), Chile (Abarca *et al.*, 2007); Costa Rica (Ábrego *et al.*, 2009); Brasil (Santos *et al.*, 2013); Argentina (Cicutin *et al.*, 2014a, 2014b); Perú (Tateishi *et al.*, 2015); México (Almazán *et al.*, 2016); Colombia (Vargas *et al.*, 2016) y Uruguay (Carvalho *et al.*, 2017).

La prevalencia varía de acuerdo a la técnica empleada como la condición del grupo de estudio (presencia o ausencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad) (Sainz *et al.*, 2015).

Mediante PCR, la prevalencia de *A. phagocytophilum* en perros se ha reportado en Europa, países como Italia: 7.5% (Alberti *et al.*, 2005), 1.3% en perros trombocitopénicos (De Arcangeli *et al.*, 2018). En América, EE.UU: 3.1% (7/222) en perros sanos y 37.5% (19/51) en perros con signos compatibles (Beall *et al.*, 2008), Colombia: 1.1% (1/91) en perros con antecedentes de garrapatas (Vargas *et al.*, 2016).

En infecciones por *A. platys*, mediante PCR, se ha reportado en Europa países como Italia: 2.5% (Alberti *et al.*, 2005), 4% en perros como mascotas, de perreras y de caza (De la Fuente *et al.*, 2006), 52.9% (Ramos *et al.*, 2014), 5.9% en perros con signos compatibles de Anaplasmosis y presencia de garrapatas (Zobba, *et al.*, 2015). En Asia, Japón: 32% en perros callejeros (Motoi *et al.*, 2001). En África, Argelia: 5.4% en perros clínicamente sanos (Dahmani *et al.*, 2015), Marruecos: 7.5% (Khatat *et al.*, 2017). En Oceanía, Australia: 46% y 32% en perros clínicamente sanos, respectivamente (Brown *et al.*, 2001, 2006).

Asimismo, en América, EE.UU: 50% (Hoskins *et al.*, 1988), 74% (Bradfield *et al.*, 1996), 33% en perros provenientes de una perrera, Carolina del norte (Kordick *et al.*, 1999); Venezuela: 16% en perros militares (Huang *et al.*, 2005); Chile: 30% en perros con signos compatibles a erliquiosis como trombocitopenia y hemorragias (Abarca *et al.*, 2007); Brasil: 15.84% en perros con corpúsculos de inclusión en plaquetas (Ferreira *et al.*, 2007), 14.9% en perros trombocitopénicos y no trombocitopénicos (Santos *et al.*, 2009), 55% en perros con signos compatibles a hemoparásitos (Ramos *et al.*, 2009), 14% (Lasta *et al.*, 2013), 6.03% en perros sin signos clínicos (Santos *et al.*, 2013); Costa Rica: 6.3% en perros con signos compatibles a Anaplasmosis/Erliquiosis (Ábrego *et al.*, 2009); Argentina: 21% en perros compatibles con Anaplasmosis o Erliquiosis y sanos (Eiras *et al.*, 2013), 13.5% y 37.6% en perros clínicamente sanos, respectivamente (Cicuttin *et al.*, 2014a, 2014b); Perú: 1.4% en perros con signos compatibles a Anaplasmosis (Tateishi *et al.*, 2015); México: 3% en perros clínicamente sanos (Almazán *et al.*, 2016); Colombia: 2.19% en perros infestados por garrapatas (Vargas *et al.*, 2016); Uruguay: 4.2% en perros sanos y signos compatibles con anaplasmosis (Carvalho *et al.*, 2017).

Beall *et al.* (2008), en Minnessota, hallaron una seroprevalencia del 29% (217/731) de perros sanos y enfermos frente a *A. phagocytophilum*, mediante el Test SNAP® 4Dx®; además un 22% (22/89) en perros únicamente enfermos, mientras que Eberts *et al.* (2011) encontraron un 61% (11/18) en perros con signos compatibles a Anaplasmosis y diagnosticados por PCR en un área endémica para *I. scapularis*.

En Marruecos, Khatat *et al.* (2017) hallaron en perros una seroprevalencia de 21.9% (93/425) mediante ELISA detectando anticuerpos para *Anaplasma* spp. y en dueños un 70% (7/10) mediante IFI.

Un interesante trabajo presentado por Quorollo *et al.* (2014), detectaron anticuerpos para *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *B. burgdorferi* en perros con

sospecha de enfermedades transmitidas por vectores provenientes de EE.UU, Canadá y El Caribe mediante un ELISA SNAP (SNAP M-A), que diferencia del Test SNAP® 4Dx® Plus, muestra seroreactividad individual para especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia*. Se encontró en EE.UU a partir de 6268 muestras un 4%, 3.2%, 1.6%, 3.6%, 1.5% y 8.6%, respectivamente en el orden mencionado al inicio. Por otro lado, en Canadá de 285 muestras se halló solo 3.2%, 1.1%, 1.8% y 2.1% para *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *B. burgdorferi*, respectivamente; y en El Caribe de 29 muestras se evidenció solamente un 27.6%, 3.4% y 10.3% para *E. canis*, *phagocytophilum*, *A. platys*, respectivamente. Estos valores estarían influenciados por la mayor prevalencia de *R. sanguineus* en el Caribe a diferencia de EE.UU donde predomina *Ixodes spp.*

En la Provincia de Loja (Ecuador) se halló una seroprevalencia del 53.8% (38/80) mediante el Test SNAP® 4Dx® y visualización de CI o mórulas compatibles con *Anaplasma spp.* en un 47.5% (43/80) de perros provenientes de los barrios rurales (Peñaloza, 2015). En contraste, en la ciudad de Azogues del mismo país no lograron evidenciar CI o mórulas compatibles a la Anaplasmosis canina (Ulloa, 2018).

Con la misma prueba serológica, en Colombia, McCown *et al.* (2015) reportaron una seroprevalencia de 33% (161/498) para *Anaplasma spp.* en perros vagabundos y provenientes de clínicas.

Por otro lado, Álvarez *et al.* (2015) reportaron una seroprevalencia del 43.7% (35/80) para *Anaplasma spp.* en perros provenientes de la comuna de Puchuncaví y Quintero (Valparaíso - Chile), mediante Test SNAP® 4Dx® Plus.

En Lima, Perú, se halló seropositividad en un perro que presentaban signos inespecíficos como decaimiento, palidez de mucosas con petequias y equimosis en piel, mediante el test SNAP® 4Dx® contra *Anaplasma spp.* y *B. burgdorferi*; sin embargo, no se realizó la confirmación por PCR (Rubio *et al.*, 2011). Posteriormente, un estudio determinó por primera vez la presencia de ADN de *A. platys* 1.4% (2/144) en perros con signos clínicos compatibles con anaplasmosis (Tateishi *et al.*, 2015).

En Piura, Perú, se determinó mediante el SNAP® 4Dx®, una seropositividad del 4.2% (3/71) para *Anaplasma spp.* en perros con antecedentes de enfermedad e historial de garrapatas (Naranjo, 2018).

En la Ciudad de Chiclayo, Perú, se halló una seroprevalencia de 35%, 56% y 73% frente a *Anaplasma* spp. en los distritos de Chiclayo, José Leonardo Ortiz y la Victoria, respectivamente en caninos atendidos en clínicas mediante el kit Vet Scan Anaplasma Rapid Test (Delgado y Montoya, 2018).

2.3.5. COINFECCIÓN Y COINFECCIONES MÚLTIPLES

Desde tiempos anteriores ya se evidenciaba en perros la coinfección de *A. platys* y *E. canis* (French y Harvey, 1983; Harrus *et al.*, 1997) y la coinfección de *A. phagocytophilum* con *B. burgdorferi* (Qurollo *et al.*, 2014) por tener el mismo vector, las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* spp., respectivamente. Con el transcurso de los años, se ha demostrado que puede llegar a existir coinfecciones múltiples por *Ehrlichia* spp, *Babesia* spp, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp. incluso en humanos potenciando la enfermedad (Sainz *et al.*, 2015).

En Grecia se determinó serológicamente mediante IFA coinfecciones múltiples entre *A. platys*, *E. canis*; *E. equi* (*A. phagocytophilum*) y *Rickettsia rickettsii* en perros con signos clínicos. Todos evidenciaban corpúsculos de inclusión en plaquetas (Kontos *et al.*, 1991).

En España, Sainz *et al.* (1999) reportaron un caso clínico de un perro con infestación masiva de garrapatas y signos clínicos de Anaplasmosis/Erliquiosis con presencia de títulos altos mediante IFA, anticuerpos contra *A. platys* y *E. canis*. Además, en su frotis sanguíneo se evidenció corpúsculos de inclusión en plaquetas y eritrocitos compatibles con *A. platys* y *Babesia*, respectivamente.

En China, identificaron molecularmente *A. platys* y *E. canis* en dos perros con signos clínicos de fiebre, epistaxis y mucosas pálidas (Hua *et al.*, 2000).

Suksawat *et al.* (2001) evaluaron una muestra proveniente de un canino de Venezuela con signos compatibles de Erliquiosis. En la hematología encontraron anemia, leucopenia y linfopenia. En el frotis hallaron mórulas en granulocitos y plaquetas, además gametocitos de *Hepatozoon* spp. en neutrófilos. Se realizó el PCR detectando *E. canis*, *E. platys* (*A. platys*) y *E. equi* (*A. phagocytophilum*).

En Japón, se detectó en perros vagabundos un 8% (6/80) de positividad mediante PCR para *A. platys* de los cuales 2 de los positivos también reaccionaron para *Babesia* spp., cabe resaltar

que todas las muestras positivas de *A. platys* fueron negativas para *E. canis* (Inokuma *et al.*, 2002).

En Lara, Venezuela, se halló mediante pruebas moleculares una prevalencia del 16% de *A. platys* (7/43), 31% de *E. canis* (13/43) y ausencia de *A. phagocytophilum* y *E. ewingii*. Además, el 29% de los positivos para *A. platys* (2/7) se halló coinfección con *E. canis*. Las garrapatas como muestras sanguíneas de sus entrenadores resultaron ser negativas (Huang *et al.*, 2005).

En Australia, de un total de 215 perros vagabundos aparentemente sanos, hallaron molecularmente en un 32% (69/215) *A. platys*, 10% (22/215) *B. canis vogeli* y una coinfección del 11% (24/215) de ambos agentes. Los resultados fueron similares mediante la visualización directa en frotis sanguíneo (Brown *et al.*, 2006).

En Brazil, Santos *et al.* (2009) mediante Nested PCR detectaron *A. platys* 33/221 (14.9%), *E. canis* 86/221 (38.9%) y *Babesia* spp. 18/221 (8.1%) en un estudio de perros trombocitopénicos versus no trombocitopénicos. Además, se halló una coinfección múltiple de los tres agentes en un mismo perro. Por otro lado, Ramos *et al.* (2009), reportaron mediante nPCR en 100 perros con signos compatibles a hemoparasitos un 55% de *A. platys* y 57% de *E. canis* a diferencia del método directo donde encontraron 21% y 9%, respectivamente. Además, este estudio demostró una coinfección en un 32%.

En Costa Rica, mediante pruebas de PCR anidado, hallaron *A. platys* en un 6.3% (19/300) en muestras provenientes de perros con signos clínicos compatibles con Anaplasmosis/ Erliquiosis y una coinfección de 2.3% (7/300) con *E. canis* (Ábrego *et al.*, 2009).

En Croacia, en un perro que solo presentaba diarreas, se evidenció anemia y trombocitopenia marcada, ligera hipoalbuminemia, elevada proteína C reactiva, incremento de nitrógeno ureico y fósforo, y en el frotis sanguíneo se hallaron mórulas en plaquetas. Al realizar el PCR mostró positividad para *A. platys* y *B. vogeli* (Dyachenko *et al.*, 2012).

Estudios realizados por Eiras *et al.* (2013) en 86 perros con sospecha de Erliquiosis/Anaplasmosis con presencia de mórulas o corpúsculos de inclusión con trombocitopenia, sin trombocitopenia o trombocitopénicos sin el hallazgo directo del agente encontrando frecuencias del 21% (18/86) y 7% (6/86) para *A. platys* y *E. canis*, respectivamente. Se halló una coinfección mediante el frotis directo de los positivos de *A. platys*

con *Hepatozoon* sp. en 22% (4/18) y 5.5% (1/18) con merozoítos de *Babesia* sp. siendo posteriormente identificados molecularmente como *Hepatozoon canis* y *Babesia vogeli*.

Breitschwerdt *et al.* (2014) hallaron una coinfección múltiple mediante PCR para *A. platys*, *E. ewingii*, *E. Chaffeensis* y *E. canis* en un cachorro de 15 semanas que provenía de Misuri (EE.UU) donde hace 4 años tras ser adoptado presentó neumonía y recibió tratamiento correspondiente. El hallazgo se realizó al evidenciarse primero en sus propietarias el malestar durante estos años sin diagnóstico alguno por parte de sus médicos.

Quorllo *et al.* (2014) mediante el SNAP M-A en muestras de 6582 perros provenientes de EE.UU, Canadá y El Caribe determinaron las coinfecciones más comunes de mayor a menor frecuencia las cuales fueron 1.4% (*E. ewingii* y *E. chaffeensis*), 1.2% (*A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi*), 0.6% (*E. ewingii* y *B. burgdorferi*) y 0.3% (*E. canis* y *A. platys*). Se hallaron seropositividades múltiples incluso frente a 5 agentes en una misma muestra.

En Argelia, África, Dahmmani *et al.* (2015) detectaron a partir de 110 muestras de sangre proveniente de perros aparentemente sanos un 5.4% (6/110) de *A. platys* y 6.3% (7/110) de *E. canis* mediante pruebas moleculares. Si bien es cierto, este estudio no evidenció coinfección alguna; sin embargo, demuestra la coexistencia de estos agentes en una misma área geográfica.

En Colombia, mediante el Test SNAP[®] 4Dx[®] encontraron una seroprevalencia de 33% *Anaplasma* spp., 62% *E. canis*, 1.6% *Dirofilaria immitis* y ausencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en perros provenientes de tres ciudades de ese país, además demostró una seropositividad múltiple del 30.1% para *Anaplasma* spp. y *E. canis*; en incluso, contra más de dos agentes en un 0.6% (McCown *et al.*, 2015).

En Colombia, Vargas *et al.* (2016) mediante pruebas moleculares detectaron la presencia de *A. platys* en 2/91 (2.2%), *A. phagocytophilum* en 1/91 (1.1%), *E. canis* en 36/91 (40%) y *Babesia vogeli* en 5/91 (5.5%) provenientes de perros con infestación de garrapatas. Se observó que, de las dos muestras positivas a *A. platys*, uno provenía de una paciente que presentaba signos clínicos resultando además positivo a *E. canis* por PCR. Por otro lado, la otra muestra positiva provenía de un paciente que no presentaba signos clínicos, pero sí había presencia de corpúsculos de inclusión en plaquetas y resultó positiva molecularmente a *E. canis* y *Hepatozoon canis*.

En Chile, Álvarez *et al.* (2015) hallaron una seroprevalencia del 40% (32/80) para *Anaplasma* spp., 1.25% (1/80) para *Ehrlichia* spp. y 3.75% (3/80) contra ambos agentes en perros de las comunas de Puchuncaví y Quintero, mediante Test SNAP® 4Dx® Plus,

Estudios realizados en Perú mediante el Test SNAP® 4Dx®, reportaron en Lima, una seropositividad para *Anaplasma* spp. y *B. burgdorferi* en un perro que presentaba signos inespecíficos como decaimiento, palidez de mucosas con petequias y equimosis en piel (Rubio *et al.*, 2011); aunque no se realizó pruebas moleculares para determinar la especie involucrada. Por otro lado, en Piura, se determinó una seropositividad del 4.2% (3/71) para *Anaplasma* spp. y 55% (39/71) para *Ehrlichia* spp. en perros con antecedentes de garrapatas y signos clínicos compatibles con Anaplasmosis resaltando que todos los seropositivos a *Anaplasma* spp. también presentaron anticuerpos contra *Ehrlichia* spp. (Naranjo, 2018).

2.4. PATOGÉNESIS

La patogénesis se inicia desde la mordedura de una garrapata sana a un perro infectado donde adquiere el agente *Anaplasma* spp. Las bacterias migran a través del cuerpo pasando al intestino e ingresando a los hemocitos y glándulas salivales para que puedan infectar con éxito a un nuevo hospedero objetivo (Greene, 2012) enfrentándose en todo momento con la respuesta inmune innato como defensinas y micropulsina específico del artrópodo, proteínas de la familia 5.3 kDa, un sistema similar al complemento, lisozimas y hemocitos fagocíticos (Day, 2016).

En infecciones por *A. phagocytophilum* se ha identificado la participación de la proteína (P11) que es secretada por esta bacteria para infectar los hemocitos en la hemolinfa facilitando la distribución del intestino hacia las glándulas salivales para su reserva (Day, 2016).

Estos artrópodos deben continuar con su ciclo biológico y nuevamente necesitan alimentarse en un nuevo hospedero. Las garrapatas poseen mecanismos básicos para obtener sangre desde la penetración de la barrera epidermal del hospedero y la secreción de moléculas vasoactivas - anticoagulantes permitiendo a nivel local el flujo de sangre y su consumo; además, de potentes moléculas derivadas por éste que modulan la respuesta inmune e inflamatoria cutánea del hospedador que son inyectados en el sitio de alimentación a través de las secreciones salivales contaminadas con *Anaplasma* spp. creando un ambiente óptimo y oportuno para la infección (Greene, 2012; Day, 2016).

La patogenia de la anaplasmosis granulocítica aún no se conoce completamente. La transmisión de *A. phagocytophilum* de la garrapata a los mamíferos se realiza aproximadamente dentro de las 24 a 48 horas tras la mordedura de la garrapata *Ixodes* spp. (Dinitz y Breitschwerdt, 2012) propagándose dentro del mamífero a través de la sangre o linfa (Day, 2016).

El período de incubación para *A. phagocytophilum* varía de 7 a 14 días infectando principalmente a las células más diferenciadas del linaje de los neutrófilos (Dinitz y Breitschwerdt, 2012). En esta etapa ocurre la adhesión mediante la selectina P, que es abundante en la superficie de las bacterias, ingresando a los neutrófilos por endocitosis (Greene, 2012).

Dentro de las células, las bacterias se incorporan en los fagosomas (*A. phagocytophilum* previene la fusión del fagolisosoma) y se multiplican por fisión binaria formando las mórulas (Popov *et al.*, 1998). La membrana celular de la célula diana (neutrófilo principalmente) produce la liberación de los microorganismos por citólisis, facilitando así la infección de otras células y múltiples órganos (Greene, 2012; Day, 2016). La bacteria puede activar mecanismos patógenos que impiden su destrucción por las células del sistema inmunológico (Dumler *et al.*, 2005). El mal funcionamiento de los neutrófilos infectados interfiere con los mecanismos de defensa inmunológica (fagocitosis y motilidad), teniendo como resultado una inmunidad deteriorada lo que puede facilitar a infecciones secundarias (Day, 2016).

A. phagocytophilum se mantiene principalmente en neutrófilos circulantes y con poca frecuencia en tejidos periféricos y hematopoyéticos. Se ha observado que puede infectar en células progenitoras en médula ósea (Bayard-McNeeley *et al.*, 2004) y células endoteliales (Herron *et al.*, 2005).

A. phagocytophilum, se adapta para vivir dentro de los neutrófilos reduciendo la oxidación de productos de la célula por lo que permite la supervivencia de este agente (Syke y Foley, 2014).

En caso de *A. platys*, esta bacteria se adhiere a las plaquetas e ingresan por endocitosis y se replica por fisión binaria dentro de una a tres vacuolas revestidas de una membrana, lo que resulta en la formación de mórulas (1 a 15 organismos por vacuola) que son evidentes en la sangre 10 a 14 días después de la inoculación intravenosa coincidiendo con la aparición de trombocitopenia (Harvey *et al.*, 1978; Gaunt *et al.*, 1990). La gravedad de la trombocitopenia y el porcentaje de plaquetas infectadas son más altas durante el primer ciclo de infección (Baker

et al., 1987). Luego el recuento plaquetario vuelve a la normalidad en 3-4 días para nuevamente darse otro ciclo de parasitemia y trombocitopenia de 7-14 días; conforme va pasando los ciclos el porcentaje de plaquetas infectadas disminuye haciendo que la trombocitopenia sea menos pronunciada y en algunos cesen (Harvey *et al.*, 1978). Asimismo, se han encontrado en macrófagos organismos de *A. platys* a los 14 días después de la infección, pero posiblemente éstos sean el destino de las plaquetas infectadas y no necesariamente un sitio de replicación (Greene, 2012). Mientras que en otra investigación se hallaron inclusiones redondas a ovaladas de 1 a 3 por célula (1-2 µm de diámetro) en megacariocitos y promegacariocitos la cual podría estar implicada de manera directa con la producción de plaquetas (De Tommasi *et al.*, 2014).

La trombocitopenia es el hallazgo hematológico más común en la Anaplasmosis canina (Gaunt *et al.*, 2010; Eberts *et al.*, 2011; Bouzouraa *et al.*, 2016; Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018) y puede desarrollarse como consecuencia de una lesión directa a las plaquetas o progenitores por parte de organismos replicantes (en caso de *A. platys*) (De Tommasi *et al.*, 2014), destrucción por mecanismos inmunitarios (anticuerpos antiplaquetarios) (Harvey *et al.*, 1978; Eberts *et al.*, 2011; Chirek *et al.*, 2018), aumento del consumo de plaquetas debido a la coagulación intravascular diseminada (CID) y secuestro en un bazo agrandado (Warner *et al.*, 1995; Wong y Thomas, 1998; Nelson y Couto, 2014; Bouzouraa *et al.*, 2016).

No necesariamente un cuadro trombocitopénico produce hemorragias. Ésta puede deberse a lesiones vasculares inducidas por la respuesta inflamatoria sistémica que se produce en perros infectados con *A. platys* (p. ej. vasculitis mediada por el sistema inmunitario) (Ferreira *et al.*, 2007).

2.5.SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos de la anaplasmosis canina son muy inespecíficos y similares a otras enfermedades como Erliquiosis, Babesiosis, Enfermedad de Lyme, etc. (Oliva, 2015).

La enfermedad puede presentarse de manera aguda, subaguda y crónica pudiendo manifestar signos clínicos desde leves a muy graves (en caso de coinfecciones) e incluso sin presentación alguna (subclínica) mostrándose un animal aparentemente sano siendo la presentación más frecuente (Carrade *et al.*, 2009; Kohn *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2017; Contreras *et al.*, 2018). Las coinfecciones pueden empeorar las manifestaciones clínicas y enmascarar la enfermedad complicando el diagnóstico (Sainz *et al.*, 2015).

Las infecciones subclínicas pueden persistir durante meses o años antes de que ocurra la eliminación inmunológica o terapéutica de la infección o el desarrollo de manifestaciones de enfermedad crónica (Breitschwerdt *et al.*, 2014).

Los signos clínicos reportados en infecciones por *A. phagocytophilum* son fiebre, anorexia, letargo, alteraciones en el sistema nervioso y cojera (Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018). Existen casos raros reportados como colapso, tos leve, uveítis, inyección escleral, polidipsia/poliurea, edema de extremidades (Sainz *et al.*, 2015).

En Baster, Minesota, un estudio al examinar a 18 perros con diagnóstico hematológico y molecular para *A. phagocytophilum* los signos clínicos hallados fueron fiebre 89% (16/18), letargo 72% (13/18), cojera y dolor asociada a artropatía 55% (10/18), linfadenopatía 6% (1/18), disfunción cerebral izquierda con movimientos circulares 6% (1/18), hiperpatía cervical 6% (1/18), epistaxis 6% (1/18) y gastritis 6% (1/18) (Eberts *et al.*, 2011). Similares resultados hallados por Chirek *et al.* (2018) encontraron letargo y actividad reducida en un 83% (52/63), inapetencia 63% (40/63), fiebre 67% (42/63), cojera 16% (10/63), diarrea 14% (9/63), hemorragia 13% (8/63), vómitos 8% (5/63), dolor de articulaciones 8% (5/63), linfadenopatía 6% (4/63), signos neurológicos 5% (3/63), tos 5% (3/63), dolor de cuello 3% (2/1), convulsión 2% (1/63) y taquipnea 2% (1/63).

La presentación aguda causada por *A. phagocytophilum* donde se presenta una artropatía febril es similar a la Enfermedad de Lyme causada por *Borrelia burgdorferi* que es transmitida por el mismo vector de garrapatas *Ixodes* spp. (Greene, 2012). Según el trabajo de investigación realizado por Eberts *et al.* (2011), a estos perros se les detectó la presencia de anticuerpos mediante ELISA (Test SNAP® 4Dx®) contra *B. burgdorferi* 17% (3/18) no mostrando ninguna severidad de signos clínicos como hematológicos en esta posible coinfección frente a los seronegativos; a diferencia del estudio por Beall *et al.* (2008) que menciona que la infección secuencial y/o coinfección con patógenos transmitidos por vectores complican las presentaciones clínicas patológicas en animales y seres humanos afectando la gravedad y duración de la enfermedad y/o alterar la respuesta del tratamiento.

En el caso de infecciones por *A. platys* la mayoría presentan cuadros subclínicos (Harvey *et al.*, 1978; Harrus *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005; Ulutas *et al.*, 2007; Gaunt *et al.*, 2010) y con frecuencia se hallan cuadros agudos teniendo signos clínicos muy similares a la Erliquiosis canina y hemorragia (Harrus *et al.*, 1997; Beaufils *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2007; Bouzouraa *et al.*, 2016).

En Uruguay, se realizó un estudio para detectar mediante pruebas moleculares *A. platys* y *E. canis* en perros con y sin signos clínicos compatibles obteniendo como resultado 4.2% (8/191) positivo solo a *A. platys*, curiosamente estos perros no mostraban signos clínicos compatibles (Carvalho *et al.*, 2017). Sin embargo, se informó de un curso severo de infección experimental únicamente por *A. platys* con hemorragia equimótica causada por una cepa griega patógena (Kontos *et al.*, 1991). En un estudio de perros positivos por PCR hallaron anorexia 62.5%, pérdida de peso 43.8%, linfadenomegalia 43.8%, hipertermia 40.6%, hemorragia 37.5%, letargo 34.4%, trastornos musculoesqueléticos 21.9%, deshidratación 12.5% e inflamación ocular 12.5%, cabe mencionar que menos de la mitad presentaban coinfecciones con *E. canis*; *B. vogeli*, *Hepatozoon canis* y *Leishmania infantum* (diagnosticados molecularmente) aunque en las infecciones únicas por *A. platys* la frecuencia de los signos clínicos se mantiene, excepto que se reportaron más casos de hemorragia en infecciones únicas (únicamente *A. platys*) que en coinfecciones siendo un 46.7% y 38.5%, respectivamente (Bouzouraa *et al.*, 2016). La inflamación ocular ya había sido reportada antes en un cachorro de 9 meses, era de presentación bilateral, además presentaba corpúsculos de inclusión en plaquetas y seroconversión (Glaze y Gaunt, 1986).

Se ha evidenciado lesiones cutáneas de origen inexplicable como eritemas, pápulas y placas en perros y que respondieron al tratamiento con doxiciclina tras ser diagnosticados con anaplasmosis granulocítica canina. Estudios realizados en Suiza, demostraron la presencia de ADN de este agente en biopsias de piel con estas lesiones en perros seropositivos *A. phagocytophilum* (Berzina *et al.*, 2014).

Las infecciones agudas transmitidas por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. pueden causar signos clínicos antes de que el perro tenga una respuesta medible de anticuerpos (Eberts *et al.*, 2011).

En condiciones naturales, la transmisión de garrapatas influye potencialmente en el curso de la infección y las manifestaciones clínicas y, por lo tanto, es una limitación de los estudios experimentales de infección. Es probable que la coinfección o las infecciones secuenciales contribuyan a algunas de las manifestaciones "atípicas" que se han atribuido histórica y clínicamente a las infecciones por un solo patógeno (Gaunt *et al.*, 2010). Las infecciones concomitantes o patógenos adicionales presentes pueden exacerbar el curso de la infección (Dyachenko *et al.*, 2012).

2.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo de Anaplasmosis canina resulta ser un desafío ya que generalmente suelen ser de tipo subclínico (asintomáticos) y en caso de que lo presentara estos son inespecíficos; es por ello, que debe complementarse con diversas pruebas de laboratorio (hematología, citología, serología y moleculares) sumado a una buena anamnesis nos permitirá llegar al diagnóstico.

2.6.1. HEMOGRAMA

El hemograma completo es una gran herramienta diagnóstica útil para la detección de Anaplasmosis Granulocítica Canina y Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (Gaunt *et al.*, 2010; Eberts *et al.*, 2011). Debe ser considerada la primera prueba de laboratorio por ser fácil, accesible, rápida y de bajo costo pudiendo realizarse en perros enfermos y aparentemente sanos en busca de alguna alteración compatible con la enfermedad, más aún si existe evidencia de haber sido mordidos por garrapatas (Greene, 2012).

La alteración hematológica más común durante la infección por *A. phagocytophilum* y *A. platys* es la trombocitopenia y es con frecuencia el único hallazgo en perros asintomáticos (Gaunt *et al.*, 2010; Eberts *et al.*, 2011; Bouzouraa *et al.*, 2016; Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018).

La trombocitopenia causada por *A. phagocytophilum* se debe principalmente a la destrucción plaquetaria mediada por el sistema inmune, producción de factores inhibidores a nivel de la médula ósea, mayor consumo de plaquetas en la coagulación intravascular diseminada (CID) y el secuestro por el bazo agrandado (Waner *et al.*, 1995, Wong y Thomas, 1998). Diversos estudios confirman la trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario como un mecanismo patológico importante en la Anaplasmosis granulocítica canina detectando una frecuencia de anticuerpos unidos a plaquetas en un 44 a 56% en perros trombocitopénicos diagnosticados con la enfermedad (Kohn *et al.*, 2008; Chirek *et al.*, 2018).

La fase aguda de la infección por *A. platys* se caracteriza por trombocitopenia cíclica que persiste durante 7 a 14 días, seguida de un corto período de recuperación, durante el cual los recuentos de plaquetas generalmente vuelven a la normalidad (Harvey *et al.*, 1978; French y Harvey, 1983) La trombocitopenia por *A. platys* se debe a la fagocitosis plaquetaria, destrucción inmunomediada y lesión directa por parte de los microorganismos replicantes (Harvey *et al.*,

1978; Gaunt *et al.*, 2010). Otros estudios muestran la infección de las células precursoras de plaquetas (megacariocitos) que también estarían implicadas en el mecanismo de la trombocitopenia al alterar la producción de éstas (De Tommasi *et al.*, 2014).

Entre las alteraciones hematológicas inducidas por *A. phagocytophilum* encontramos anemia y leucopenia (linfopenia y eosinopenia) (Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011; Yancey *et al.*, 2017; De Arcangeli *et al.*, 2018); similares a otro estudio en 63 caninos con signos clínicos y diagnosticados mediante PCR evidenciaron trombocitopenia un 86%, anemia 70%, monocitosis 48%, linfopenia 50%, leucocitosis 27% y leucopenia 14% con la única diferencia de que la leucocitosis tuvo mayor frecuencia que la leucopenia (Chirek *et al.*, 2018).

Estudios realizados por Bouzouraa *et al.* (2016), además de la trombocitopenia, evidenciaron una marcada anemia en perros infectados naturalmente con *A. platys*. Se hallaron con baja frecuencia leucocitosis y leucopenia. Los resultados de reticulocitos eran bajos sugiriendo una anemia de tipo no regenerativa. Además, se sospecha que esta bacteria al igual que *A. phagocytophilum* podría afectar la médula ósea por el hallazgo de bicitopenia y pancitopenia.

2.6.2. CITOLOGÍA

La citología del frotis sanguíneo, médula ósea u órganos en busca de estructuras compatibles con *Anaplasma* sp. y de otros agentes que pueden parasitar células sanguíneas aporta mucha información para dilucidar nuestros posibles diagnósticos diferenciales. Es un método simple, económico y rápido. Se recomienda realizarlo tras hallar alguna alteración hematológica, más aún, si la incidencia de donde viene el perro la frecuencia de enfermedades transmitidas por vectores es alta.

En infecciones por *A. phagocytophilum*, éstas se pueden visualizar como microcolonias similares a moras de color púrpura (más oscuras que el del núcleo) llamadas “mórulas” en granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) (Rikihisa *et al.*, 1997; Popov *et al.*, 1998; Eberts *et al.*, 2011) en frotis sanguíneo mediante tinción May-Grünwald, Wright o Wright-Giemsa (Dumler *et al.*, 2001; Day, 2016) En la infección experimental, se han detectado mórulas en 3 a 34% de los neutrófilos de sangre periférica dentro de 4 a 14 días después de la infección (Egenvall *et al.*, 2000; Lilliehook *et al.*, 1998). Un estudio realizado por Eberts *et al.* (2011) halló hasta un 94% de mórulas en neutrófilos en sangre de perros infectados naturalmente diagnosticados mediante PCR.

Las mórulas de *A. phagocytophilum* proporcionan información de diagnóstico rápido, pero no están presentes en todas las infecciones, además éstas son indistinguibles de las mórulas *E. ewingii* que también infecta a granulocitos (Greig y Armstrong, 2006; Greene, 2012).

Los organismos de *A. platys* aparecen como inclusiones o mórulas basófilas en las plaquetas cuando los frotis sanguíneos se tiñen con Giemsa, azul de metileno nuevo, Diff-Quik, May Grünwald-Giemsa, Wright (Harrus *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2007; Greene, 2012; Bouzouraa *et al.*, 2016). Como la bacteriemia de *A. platys* suele ser baja, los microorganismos son difíciles de detectar en el frotis sanguíneo y generalmente se observa alrededor del 1% de plaquetas infectadas (Day, 2016) aunque se ha evidenciado experimentalmente que al inicio de la infección puede abarcar un alto porcentaje de formación de mórulas hasta en un 97% de plaquetas en el frotis sanguíneo (Arraga-Alvarado *et al.*, 1997); sin embargo, se ha detectado inclusiones ocasionales hasta 21 meses post inoculación en infecciones experimentales (Kontos *et al.*, 1991).

En un estudio, al evaluar la presencia de corpúsculos de inclusión o mórulas en plaquetas frente a PCR para la detección de *A. platys*, demostró que no existe diferencia significativa entre las pruebas siendo el análisis del frotis sanguíneo una buena alternativa para su diagnóstico (Ferreira *et al.*, 2007). Por el contrario, otro estudio realizado por Ramos *et al.*, (2009) afirmaron la superioridad de las pruebas moleculares como el nested-PCR (nPCR) frente al frotis sanguíneo tanto para *A. platys* y *E. canis*.

Dependiendo del nivel de habilidad y la experiencia del técnico, otros cambios o artefactos en granulocitos y plaquetas (otras estructuras citoplásmicas o precipitados) tienen el potencial de ser mal diagnosticados como inclusiones de *Anaplasma* spp. (Eberts *et al.*, 2011; Dyachenko *et al.*, 2012; Greene, 2012).

Otros hallazgos que se observan en el frotis sanguíneo de perros infectados con *A. platys* es la presencia de macroplaquetas pudiendo ser más grandes que los glóbulos rojos, monocitosis con monocitos que fagocitan neutrófilos y plaquetas conteniendo a los corpúsculos de inclusión (Beaufils *et al.*, 2002).

En el examen citológico de la médula ósea, durante la infección natural, no se ha evidenciado *A. phagocytophilum* en megacariocitos, más sí en una infección experimental en cultivos de células megacariocíticas humanas, pero no afectó la formación ni producción de plaquetas (Granick *et al.*, 2008).

En un estudio experimental en caninos donde se inocularon plaquetas con *A. platys* se observó en aspirados de médula ósea un aumento de megacariocitos siendo indicativo de una trombocitopenia regenerativa (Gaunt *et al.*, 1990).

En dos cachorros infectados naturalmente con *A. platys*, con signos clínicos leves y alteraciones hematológicas como anemia, neutropenia y severa trombocitopenia se hallaron inclusiones redondas a ovaladas de 1 a 3 por célula (1-2 µm de diámetro) en megacariocitos y promegacariocitos en láminas citológicas de médula ósea similares a las que se hallaron en plaquetas. Además, se encontró hiperplasia como displasia, hiperlobulación, núcleos desorganizados y emperipolesis megacariocítica (De Tommasi *et al.*, 2014). Esta infección podría repercutir en la disminución de nuevas plaquetas al ser las células progenitoras alteradas y quizás destruidas llevando a una trombocitopenia; sin embargo, falta más estudios para confirmar esta hipótesis.

La citología del líquido sinovial se recomienda siempre y cuando haya evidencia de enfermedad articular sin causa explicable y alteraciones hematológicas compatibles con Anaplasmosis granulocítica canina. En caso de infecciones por *A. phagocytophilum* se puede observar un aumento de leucocitos > 3,000 células / µl con predominio de neutrófilos (no degenerados) encontrándose las mórulas en el 1 al 10% del total de neutrófilos. Esto se puede evidenciar hasta la décima semana postinfección (Alleman, 2017).

Otros hallazgos citológicos durante la infección de *A. platys* se ha observado hiperplasia folicular y plasmocitosis en la fase aguda de la infección, y hemorragia en algunos órganos como el bazo (Baker *et al.*, 1987).

2.6.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

En infecciones por *A. phagocytophilum* se ha reportado principalmente alteraciones como hiperbilirrubinemia, aumento de transaminasas, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperfosfatemia y en menor frecuencia azotemia renal (Kohn *et al.*, 2008; Chireck *et al.*, 2018); mientras que en infecciones por *A. platys* se halló hiperproteinemia (Kontos *et al.*, 1991) y en menor frecuencia un ligero aumento de transaminasas y bilirrubina, sin observar azotemia renal (Bouzouraa *et al.*, 2016).

2.6.4. ULTRASONOGRAFÍA

Si bien es cierto, la ultrasonografía no es un método de diagnóstico para la Anaplasmosis canina, permite el hallazgo de esplenomegalia, siendo la alteración más frecuente en perros con signos clínicos y positividad por PCR a *A. phagocytophilum* afectando un 84 a 95%, y en segundo lugar la hepatomegalia de 6 a 11% (Kohn *et al.*, 2008; Chireck *et al.*, 2018). En contraste, en infecciones por *A. platys* se reporta un bajo porcentaje de esplenomegalia hallándose un 16% de los casos (Bouzouraa *et al.*, 2016).

2.6.5. PRUEBAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas permiten la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. y pueden ser de tipo cuantitativa o cualitativa. La cuantitativa mide la concentración de anticuerpos apartir de diluciones seriadas obteniendo como producto final el título del suero. Este tipo de prueba serológica permite diferenciar una infección reciente versus una exposición antigua; a diferencia de la cualitativa que solamente detecta la presencia anticuerpos (Greene, 2012; Nelson y Couto, 2014). Las más empleadas son la IFI y Test SNAP® 4Dx® Plus.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), es una prueba de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* y *A. platys*. Parece ser relativamente específica para identificar perros expuestos al agente, pues no se reportan reacciones cruzadas con *Ehrlichia canis* (Kontos *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2001; Greene, 2012). Actualmente es poco empleado para la detección de anticuerpos frente a *A. platys* pero sí es muy usado para el diagnóstico de *A. phagocytophilum* incluso en humanos (Sainz *et al.*, 2015; CDC, 2019).

En 18 perros naturalmente infectados con *A. phagocytophilum* y positivos a PCR, se buscó la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. mediante el IFI y el Test SNAP® 4Dx® concluyendo que el IFAT detectó anticuerpos en 12 perros, a diferencia del Test SNAP® 4Dx® que había detectado solo en 9 pacientes (Kohn *et al.*, 2008). En un estudio experimental en perros, al evaluar un nuevo protocolo para la detección de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* usando un Sistema de fluorescencia automatizado (sensibilidad: 95.4% y especificidad: 100) fue comparado con IFA y ELISA concluyendo que el Sistema de fluorescencia automatizado e IFA detectaron anticuerpos antes que el ELISA (Moroff *et al.*, 2014).

La prueba de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) es la más empleada en medicina veterinaria por su practicidad y que no requiere instalaciones o equipos costosos. Ya sea en el consultorio diario y en muchas investigaciones científicas, el más usado es el Test SNAP® 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc.) (Sainz *et al.*, 2015).

El Test SNAP® 4Dx® Plus es una prueba cualitativa que posee una sensibilidad del 99.1% y una especificidad del 100%, siendo el test de screening más recomendado en perros a partir de muestras de suero, plasma y sangre entera con anticoagulante. Esta prueba puede llegar a evaluar posibles “coinfecciones” al detectar la presencia de anticuerpos contra *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. ewingii*, *E. canis*, *B. burgdorferi*; y antígenos frente a Filarias. Este kit de prueba ELISA emplea antígenos purificados proporcionando una especificidad y sensibilidad superior respecto a los tests que emplean células enteras (IFI y Western blot) debido a su tecnología basada en péptidos del test SNAP®. La parte del Test SNAP® 4Dx® Plus para *A. phagocytophilum* detecta anticuerpos IgM e IgG, además de realizar reacción cruzada con *A. platys* ya que son organismos estrechamente relacionados y no tiene reacción cruzada con ninguna otra especie de rickettsia.

Como en la gran mayoría de las infecciones, el sistema inmunitario producirá elevadas concentraciones de anticuerpos IgM durante la fase aguda inicial de la infección, más adelante, en el transcurso de la infección, el sistema inmunitario comenzará a producir anticuerpos IgG cuyos niveles pueden permanecer elevados en el suero durante meses, o incluso años. En general, una muestra con el Test SNAP® 4Dx® Plus que resulta positiva frente a *A. phagocytophilum* presenta una buena correlación con un resultado positivo obtenido mediante una prueba IFA. Tener en cuenta que para que dé un resultado positivo en el Test requiere un título $\geq 1:80$ anticuerpos inmunofluorescentes, sino éstos serán considerados como negativos (IDEXX Laboratories, 2018).

Un estudio realizado por Goldstein *et al.* (2014) compararon el rendimiento de dos pruebas que detectan diversas enfermedades transmitidas por vectores para la detección de anticuerpos a *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi*. Los kits de estudio fueron el SNAP® 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc.) y AccuPlex®4 (Antech Diagnostics, Inc.). Se trabajaron con 3 grupos los cuales uno era el control, otro grupo se le había realizado el IFA para el diagnóstico de *A. phagocytophilum* y otro Western Blot para *B. burgdorferi*. Se evaluó la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de cada prueba a estudiar. La comparación de SNAP® 4Dx® Plus y AccuPlex®4 con Lyme Western blot demostró una diferencia significativa en el

rendimiento; SNAP® 4Dx® Plus fue 98.5% sensible y 95.7% específico vs AccuPlex®4 que fue 78.5% sensible y 72.9% específico. El rendimiento de SNAP® 4Dx® Plus y AccuPlex®4 en comparación con *A. phagocytophilum* por IFA produjo una sensibilidad y especificidad de 91.7% y 88.7% para la prueba SNAP® 4Dx® Plus y 75% y 82.6% para la prueba AccuPlex®4. La reproducibilidad de SNAP® 4Dx® Plus fue del 96% para *B. burgdorferi* y del 95% para *Anaplasma* sp. en comparación con AccuPlex®4, que tuvo una reproducibilidad del 89% y 79%, respectivamente. En esta comparación directa, la prueba SNAP® 4Dx® Plus demostró una mejor precisión y reproducibilidad que la prueba AccuPlex®4 para la detección de anticuerpos contra *B. burgdorferi* y *Anaplasma* sp. Esto demuestra que el SNAP® 4Dx® Plus tiene un mejor rendimiento.

La ventaja de esta prueba de ELISA son el costo, accesibilidad, evalúa varios patógenos transmitidos por vectores, fácil de usar y brinda un rápido resultado. La principal desventaja es la interpretación que el médico haga a partir de los resultados. Tener en cuenta que una seropositividad en el Test SNAP® 4Dx® Plus frente a *Anaplasma* sp. es un resultado que no permite especificar la especie del agente debido a la existencia de reacción cruzada entre *A. phagocytophilum* y *A. platys* (IDEXX Laboratories, 2018). Una desventaja de esta prueba es que su seropositividad no significa necesariamente que el agente se encuentre presente, sino que anteriormente ha sido expuesto (infección pasada) y aún persisten los anticuerpos siendo detectables en la sangre. Para este caso se debe complementar con el historial, examen clínico, alteraciones hematológicas y bioquímicas y otros para aseverar una infección presente que nos permitirá realizar prontamente un tratamiento. Por otro lado, un resultado seronegativo no necesariamente excluye una infección porque quizás aún no forme la cantidad de anticuerpos detectables para la prueba, esto se observa en la fase aguda de la infección (Eberts *et al.*, 2011).

Se ha encontrado seroconversión en infecciones experimentales en el día 14 mediante IFA (Moroff *et al.*, 2014) y mediante el test SNAP® 4Dx® a los 30 días en infecciones naturales con *A. phagocytophilum* (Yancey *et al.*, 2017). Mientras que, en infecciones experimentales con *A. platys* fueron detectados en el día 16 postinfección (rango 10-24 días) mediante el test SNAP® 4Dx® (Gaunt *et al.*, 2010). La detección temprana y persistencia de anticuerpos contra *Anaplasma* sp. depende de la prueba serológica, sistema inmunológico, si es una infección natural única o de varios agentes, dosis de inoculación y cepa del agente (Sainz *et al.*, 2015)

Estudios realizados por Kontos *et al.* (1991) en una infección experimental tras la inoculación de una cepa patógena griega de *A. platys*, se evidenció mediante IFA la presencia de títulos de anticuerpos en 1:1000 hasta el día 171 postinfección que duró la investigación.

2.6.6. PRUEBAS MOLECULARES (PCR)

El PCR, es un método de diagnóstico molecular que permite la detección directa (presencia de ADN) del agente a estudiar. Es la prueba más sensible porque permite diferenciar la especie de *Anaplasma* frente a otras enfermedades transmitidas por vectores que presentan hallazgos clínicos y hematológicos similares, además de cuantificar la carga bacteriana (Santos *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015; De Arcangeli *et al.*, 2018). Actualmente son las más empleadas en diversas investigaciones científicas (Sainz *et al.*, 2015).

La muestra más empleada para realizar un diagnóstico molecular en caninos es la sangre periférica tamponada con EDTA. Mediante este método los resultados positivos toman mayor importancia siendo evidencia de una infección activa (Kohn *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2015); sin embargo, un resultado negativo no debe pasar desapercibido ya que puede interpretarse como la ausencia del agente o una baja bacteriemia presente no detectable por la prueba dependiendo de la etapa de la enfermedad que se encuentre, por ejemplo, la infección de *A. platys* que se caracteriza por una bacteriemia intermitente.

Una ventaja frente a las pruebas serológicas es que permite su detección temprana, incluso antes de la presencia de mórulas o corpúsculos de inclusión en frotis sanguíneo y anticuerpos detectables en sangre (Moroff *et al.*, 2014). Los estudios experimentales han demostrado presencia de ADN de *A. phagocytophilum* y *A. platys* tan pronto como 2 y 3 días post infección, respectivamente; sin embargo, es limitada en infecciones crónicas donde la bacteriemia suele ser baja (Greene, 2012; Moroff *et al.*, 2014).

Otras muestras empleadas donde se ha hallado con éxito positividad son los linfonódulos, líquido sinovial y órganos. Yancey *et al.* (2017) realizó PCR de muestras obtenidas de linfonódulos en 13 perros positivos molecularmente a *A. phagocytophilum* encontrando el 85% (11/13) de positividad en linfonódulos. Otro estudio halló positividad mediante pruebas moleculares obtenidas del líquido sinovial en pacientes con poliartritis en 3 muestras de 5 perros positivos a PCR por este mismo agente (Chirek *et al.*, 2018). En Suiza, Berzina *et al.* (2014) demostraron la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* en lesiones cutáneas inexplicables en perros diagnosticados con *Anaplasma granulocítica* canina.

2.7. TRATAMIENTO

El tratamiento clásico y actualmente recomendado para Anaplasmosis canina es la doxiciclina a 5mg/kg c/12 horas ó 10mg/kg c/24 horas por 30 días (Harrus *et al.*, 1997; Beaufils *et al.*, 2002; Gaunt *et al.*, 2010; Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018). Este antibiótico también es efectivo en coinfecciones con *E. canis* y *B. burgdorferi* (Sainz *et al.*, 2015). En algunos pacientes puede causar vómitos y esto se corrige siguiendo la primera dosificación de cada 12 horas, además de proporcionarle después de la alimentación o complementando al tratamiento con un protector gástrico (Little, 2010; Sainz *et al.*, 2015). A diferencia de otras tetraciclinas no parece causar decoloración del esmalte en cachorros (Nicholson *et al.*, 2010).

Un estudio en Baster, Minnessota, Eberts *et al.* (2011) demostraron que la doxiciclina, en etapas agudas, tiene una rápida resolución de signos clínicos, incluyendo signos neurológicos, a partir de las 24 horas hasta los 6 días post tratamiento. En este trabajo se empleó una dosis de 6-8mg/kg c/12 horas y otros c/24 horas en una duración de 14 días, 21 días y 28-30 días llegando como conclusión que la duración y dosificación no influye en los resultados. Cabe mencionar que en este estudio no se realizaron pruebas moleculares para el seguimiento post tratamiento para asegurar la ausencia del agente.

Posteriormente, trabajos realizados por Yancey *et al.* (2017), determinaron la ausencia de este agente en sangre y linfonódulo por PCR confirmando la eficacia de la doxiciclina a 5mg/kg c/12 horas en el día 30 y 60 post tratamiento con mejoría de signos clínicos y alteraciones hematológicas en perros con signos compatibles con anaplasmosis y positivos a *A. phagocytophilum* mediante pruebas moleculares.

En búsqueda de otros antibióticos a la doxiciclina debido a los efectos que causa en niños y mujeres embarazadas como también una alternativa a ésta, Maurin *et al.* (2003) realizaron un estudio experimental con diferentes cepas de *A. phagocytophilum* provenientes de humanos, caballos y perros de varias regiones de EE.UU demostrando buenos efectos *in vitro* de la rifampicina y levofloxacin. La rifampicina se ha utilizado con éxito en un grupo limitado de mujeres embarazadas para el tratamiento de Anaplasmosis granulocítica humana (AGH) (Buitrago *et al.*, 1998). Faltan muchos estudios *in vivo* por realizar para demostrar su eficacia, dosificación y duración en caninos durante la enfermedad.

Investigaciones experimentales realizadas por Chang *et al.* (1997) en tres perros infectados con *A. platys* por inoculación endovenosa evaluaron la eficacia de dos antibióticos. Tras

observar plaquetas infectadas en un perro, se empleó la tetraciclina a 22mg/kg c/8 horas durante 2 semanas y en los otros dos se suministró doxiciclina a 10mg/kg c/24 horas por una semana cuyos efectos en los parámetros de plaquetas y presencia en frotis tuvieron resolución a la semana. Sin embargo, en el primer caso, semanas después de terminar la antibioterapia volvieron a aparecer las plaquetas infectadas mostrando la persistencia de *A. platys*; mientras en el segundo caso, no se evidenciaron durante las tres semanas tras terminar el tratamiento por PCR y frotis sanguíneo. Si bien es cierto la duración del tratamiento con doxiciclina fue efectiva en una semana, generalmente en infecciones naturales, se encuentra en coinfecciones con *E. canis* donde el tratamiento debería ser más largo que 21 hasta 30 días (Nelson y Couto, 2014).

Paralelamente en Israel, Harrus *et al.* (1997) demostraron la eficacia de la doxiciclina a 5mg/kg c/24 horas durante 21 días (vía oral) más el dipropionato de Imidocarb 5mg/kg c/14 días por 2 veces (vía intramuscular) en 5 pacientes diagnosticados serológicamente por IFA para *A. platys* siendo dos de ellos positivos para *E. canis*. Se vio una resolución dentro de las 48 a 72 días de los signos clínicos y ausencia de mórulas e inclusiones en el frotis sanguíneo. Similar tratamiento realizado por Sainz *et al.* (1999) con doxiciclina a 5mg/kg c/24 horas durante 28 días (vía oral) más el dipropionato de imidocarb 5mg/kg c/14 días por 2 veces (vía subcutánea) en un perro con signos clínicos y diagnosticados por IFA y frotis sanguíneo para *A. platys*, *E. canis* y *Babesia* spp. fue exitoso.

El imidocarb es muy nefrotóxico con 50% de mortalidad, se debe tener mucha precaución en pacientes renales y bajar dosis a 3mg/kg SC más fluidoterapia (Dyachenko *et al.*, 2012). Es efectivo en coinfecciones con *Babesia canis* o *Hepatozoon canis* (Sainz *et al.*, 2015).

Otros antibióticos alternativos que refieren para *A. phagocytophilum* es la tetraciclina a 22mg/kg c/8 horas por 14-21 días (vía oral); minociclina 10mg/kg c/12 horas por 10 días (vía oral o endovenosa). Igualmente, para *A. platys*, además de las anteriores, oxitetraciclina 7.5-10mg/kg c/ 8 horas por 14 -21 días (vía endovenosa) y enrofloxacin 5mg/kg c/12 horas por 14-21 días (vía oral, endovenoso o subcutáneo) (Greene, 2012).

El uso de los esteroides (prednisona o prednisolona) en el tratamiento es discutible. Se recomienda utilizarlo cuando no se observa una respuesta satisfactoria al inicio del tratamiento o surgen complicaciones inmunomediadas como anemia hemolítica, trombocitopenia, uveítis, vasculitis, glomerulonefritis, poliartritis. Se ha empleado prednisona a 0.5-2mg/kg/día y la duración varía según el tipo y gravedad de afección inmunomediada hallándose una respuesta favorable en infecciones agudas a las 24-48 horas (Kohn *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2015).

Otras terapias de apoyo cuando el cuadro sea grave o en fases crónicas se emplea transfusiones, fluidoterapia en casos de deshidratación o enfermedad renal secundaria, antipiréticos y analgésicos. En cuadros crónicos causados por la infección de *E. canis*, donde se evidencia una pancitopenia, se ha reforzado la antibioterapia al utilizarse factores de crecimiento hematopoyético (eritropoyetina), dosis baja de vincristina y glucocorticoides lo mismo que se podría extrapolar en infecciones con *Anaplasma* sp. (Sainz *et al.*, 2015).

Las decisiones del tratamiento dependen de la presentación de signos clínicos, alteraciones hematológicas, hallazgos de mórulas o corpúsculos de inclusión, pruebas bioquímicas, pruebas serológicas y moleculares. No debe basarse únicamente de la prueba serológica (cualitativa). El perro seronegativo podría haberse infectado recientemente, mientras que el perro seropositivo podría haber estado expuesto meses antes y ya había eliminado el organismo a través de una inmunidad innata (Eberts *et al.*, 2011). En los últimos años la infección secuencial y la coinfección con otros patógenos transmitidos por vectores complican las presentaciones clínico-patológicas en animales afectando la gravedad, duración de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Beall *et al.*, 2008; Gaunt *et al.*, 2010; De Tommasi *et al.*, 2014)

2.8. PREVENCIÓN Y CONTROL

A diferencia de otras enfermedades, actualmente no existe vacuna para prevenir la Anaplasmosis canina.

La prevención y control parte en un inicio en las acciones que tenga el propietario con su mascota. Aquí la importancia del médico veterinario en educar, orientar y brindar la información respectiva a los dueños de pacientes sanos o que hayan adquirido alguna enfermedad transmitida por garrapatas. Esto ayudará a prevenir la transmisión e infección a otros nuevos hospedadores, incluyendo al hombre.

Las medidas preventivas se centran en el control de las garrapatas por ser su presencia el principal factor de riesgo en animales y humanos. Tener en cuenta que muchas enfermedades pueden transmitirse durante las primeras 3 a 48 horas post fijación del vector. Existen en el mercado veterinario diversos productos en diferentes presentaciones desde aerosoles, repelentes químicos (collares), repelentes ultrasónicos (dispositivos), talcos, champús, baños medicados, pipetas y pastillas orales. Éstos previenen la mordedura del vector o eliminan la garrapata adherida al canino antes de que le dé tiempo de transmitir la infección. Elegir el producto y presentación dependerá de la preferencia de uso, duración de protección, necesidades

terapéuticas si hay coinfecciones con otros vectores como pulgas, mosquitos y ácaros (componente químico y mecanismo de acción), estado fisiológico (cachorro, adulto, gestante, lactante) y de salud (sanos o con problemas renales, hepáticos, piel etc). La eficacia de estos productos dependerá del cumplimiento de las indicaciones del fabricante (CDC, 2019).

Un complemento, a lo anterior, es la fumigación del ambiente externo (jardines) e interno (alfombras, debajo de sillones, grietas de pisos y paredes) por la presencia de huevos, larvas o ninfas - adultos que se encuentran en invernación. Las larvas pueden sobrevivir hasta un año sin alimentarse. Se recomienda fumigar las paredes hasta un metro de altura porque las garrapatas suelen trepar hasta esa altura incluyendo las rajaduras y esquinas. Siguiendo siempre la indicación y con las medidas de seguridad correspondiente según del producto por ser nocivos para la salud (CDC, 2019).

Se debe evitar que el perro tenga contacto con terrenos abandonados, campos y arbustos porque pueden infestarse y traer consigo a las garrapatas hacia los hogares. Si bien es cierto, es inevitable no llevar a nuestras mascotas a los parques o sitios con mucha vegetación, se recomienda, tras regresar a casa, revisar el pelaje para detectar alguna garrapata para que puedan ser retiradas a tiempo. En caso de que la garrapata esté impregnada a la piel retirar con pinzas cerca de ésta y jalar hacia afuera usando una presión constante, la garrapata no debe ser exprimida o retorcida ya que puede dejar alguna parte de la garrapata permaneciendo en la piel y limpiar en la herida con algún desinfectante (CDC, 2019).

La prevención frente a garrapatas en humanos también es imprescindible, más aún si se recurre a zonas con mucha vegetación. Se recomienda usar repelentes que contengan DEET, picaridin, IR3535, aceite de eucalipto de limón (OLE), para-mentano-diol (PMD) o 2-undecanona. Además de estar bien cubiertos con ropas de mangas largas y pantalón que cubra mayor parte de la piel (CDC, 2019).

Las ropas y equipos se pueden tratar con productos que contengan un 0,5% de permetrina. La permetrina se puede usar para tratar botas, ropa y equipo de campamento y se mantiene protectora durante varios lavados (CDC, 2019).

Siempre la mascota debe estar al día con su producto para el control de garrapatas a pesar de que no evidencie ninguna, ya que se ha reportado casos con la enfermedad sin hallarse el vector al examen clínico (CDC, 2019).

En caso de animales enfermos, seguir el correcto tratamiento hasta su resolución y control periódico de la enfermedad para evitar la transmisión y diseminación de estos agentes infecciosos.

2.9.ZOONOSIS

En la actualidad existen varios estudios y reportes donde demuestran, mediante pruebas serológicas y moleculares, zoonosis causadas por *A. phagocytophilum* y *A. platys*; sin embargo, la Anaplasmosis granulocítica humana (AGH) causada por *A. phagocytophilum* toma una gran importancia por la incidencia actual que representa a diferencia de *A. platys* que recién en humanos se está haciendo conocer (Dumler *et al.*, 2001, 2005).

A. phagocytophilum es el agente responsable de la anaplasmosis granulocítica humana (HGA) teniendo un gran impacto en la salud pública (Dumler *et al.*, 2001, 2005). Fueron descritas por primera vez en humanos en los años 90 hasta la actualidad con una incidencia de casos en aumento (CDC, 2019). Entre los síntomas frecuentes se halla malestar general como fiebre, dolor de cabeza, tos, dolor lumbar, mialgia, escalofríos, confusión incluso trastornos gastrointestinales y entre menos frecuentes tenemos artralgia, conjuntivitis, linfadenomegalia, disuria, y edema periférico (Woldehiwet, 2010). Si no se diagnostica a tiempo puede llegar a ser potencialmente mortal. Síntomas similares se presenta en infecciones por *A. platys* (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014).

El número de casos de Anaplasmosis humana causadas por *A. phagocytophilum* reportados a la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ha ido en aumento de 348 casos en el 2000 a 5762 en 2017 con una incidencia de 1.4 a 17.9 casos por millón de personas en los años 2000 a 2017 y la tasa de letalidad se sigue manteniendo por debajo del 1% (CDC, 2019).

Las personas con bajas defensas (pacientes con quimioterapias, VIH, trasplantes de órganos entre otros) son más susceptibles a tener cuadros más severos si son infectadas (CDC, 2019) y más aún en casos de coinfecciones (Maggi *et al.*, 2013; Arraga-Alvarado *et al.*, 2014; Breitschwerdt *et al.*, 2014). Otro factor de riesgo es la ocupación laboral, por ejemplo, médicos veterinarios que están siempre en contacto con caninos y felinos enfermos infestados por garrapatas (Maggi *et al.*, 2013; Weinborn *et al.*, 2018), trabajadores de campos (Máttar y Parra, 2006) e incluso los mismos propietarios que tienen mascotas en sus hogares (Abarca *et al.*, 2008; Breitschwerdt *et al.*, 2014).

Los métodos de diagnóstico y tratamiento son similares al de los caninos por tanto la detección temprana tiene un pronóstico favorable (CDC, 2019).

En 1996, en Venezuela se reportó un caso compatible con Erliquiosis en una niña (seropositiva a anticuerpos anti- *E. Chaffeensis* mediante IFAT), además de presentar las mórulas en leucocitos, también se hallaron corpúsculos de inclusión en plaquetas compatibles con la infección de *A. platys* aunque nunca fueron confirmadas molecularmente (Arraga-Alvarado *et al.*, 1996).

Máttar y Parra (2006) realizaron un estudio en Colombia para determinar la seroprevalencia mediante IFA para la detección de IgG para *A. phagocytophilum*, *Bartonella* spp. y *Coxiella burnetii* encontrando un 20%, 37% y 26.6%, respectivamente, en personas que tenían como actividad trabajar en el campo.

En Chile, se halló una seroprevalencia de anticuerpos *anti-Anaplasma* sp. del 18.5% en personas que tenían contacto con perros erliquiosos; y 3.3% en personas que no habían tenido contacto con perros erliquiosos ni garrapatas (Abarca *et al.*, 2008).

En una médica veterinaria de 27 años que anteriormente había realizado diversos trabajos como tratamientos en un hospital de animales menores e investigación anatómica haciendo disección de animales salvajes estando en contacto con diversos ectoparásitos, rasguños y mordeduras por los animales se halló una coinfección mediante pruebas moleculares y serológicas para *A. platys*, *Bartonella henselae* y *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Durante casi dos años presentó episodios de desmayos, migrañas, fotofobia, dolores musculares, convulsiones, anomalías neurológicas y neurocognitivas que fueron disminuyendo tras recibir el tratamiento indicado. En ningún momento presentó fiebre o alteraciones hematológicas (Maggi *et al.*, 2013).

Mediante PCR se diagnosticó una coinfección por *A. platys*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis* en una madre (57 años) e hija (16 años) tras adoptar a un cachorro de 15 semanas proveniente de Misuri (EE.UU), región endémica para erliquiosis transmitidas por garrapatas. El cachorro era cuidado por ellas principalmente y a veces recibían mordidas. Cabe mencionar que cuando fue adoptado, el cachorro presentó una neumonía, luego se recuperó y posteriormente optó un comportamiento agresivo. El cachorro además de las otras infecciones halladas en sus propietarias se le diagnosticó *Ehrlichia canis*. La madre había desarrollado un edema subcutáneo intermitente y aumento leve de enzimas hepáticas; mientras que la hija, un dolor en

la parte superior del cuerpo. No se evidenció síntomas o alteraciones hematológicas compatibles a Anaplasmosis/Ehrliquiosis. Todos recibieron tratamiento (madre y perro) y se recuperaron mostrando un PCR negativo a estos agentes. Aquí se confirma la zoonosis ya que descubrieron que el ADN implicado para anaplasma y erliquia fueron idénticas tanto para la madre, hija y perro (Breitschwerdt *et al.*, 2014).

En Venezuela, Arraga-Alvarado *et al.* (2014) reportaron 2 casos de positividad mediante PCR para *A. platys* en dos mujeres (29 años y 50 años) que presentaban disminución del apetito, malestar general, dolor muscular, dolor de cabeza, escalofríos, insomnio y además habían tenido contacto con perros compatibles con Anaplasmosis (uno sí fue confirmado). La primera mujer nunca presentó alteraciones hematológicas. La segunda mujer presentó una pancitopenia e infección con el virus del Epstein-Barr, citomegalovirus y virus del dengue.

En Marruecos, se halló una seropositividad mediante IFA para la detección de IgG contra *A. phagocytophilum* un 37% (51/138) en adiestradores de perros militares y policiales; y 21.7% (41/115) en donadores de sangre (Khatat *et al.*, 2016). Esto es alarmante porque existe una alta probabilidad de que se transmita el agente durante las transfusiones. Al año siguiente se realizó otra seroprevalencia encontrando un 70% en propietarios, pero esta vez realizando pruebas moleculares y serológicas en sus perros encontrando un 7.5% (27/362) para *A. platys* y 21.9% (93/425) frente a *Anaplasma* spp. (Khatat *et al.*, 2017).

En Chile, se realizó un estudio en una población con riesgo ocupacional para determinar la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en un hospital veterinario hallándose una seropositividad de 25.9% (15/58). De los seropositivos, según la actividad que desarrollaban con sus mascotas, el 37.5% bañaban y dormían con sus mascotas (Weinborn *et al.*, 2018).

En relación a los estudios mediante serología para *Anaplasma* spp. falta complementar con pruebas moleculares para identificar la especie ya que estos dos agentes pueden hacer reacción cruzada a la serología.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO

El estudio fue realizado en el distrito de Chiclayo perteneciente a la provincia del mismo nombre ubicado en el departamento de Lambayeque (Perú) durante el mes de enero del año 2019. Éste se encuentra en la costa norte a 27 msnm con coordenadas geográficas entre los 06°46'19" de latitud sur y 79°50'21 de longitud oeste presentando un clima subtropical con una temperatura máxima de 32°C con 75% de humedad condicionando un ambiente favorable para la propagación de los vectores e incidencia de enfermedades rickettsiales en caninos.

La colección de muestras sanguíneas se realizó por medio de campañas para descarte de Anaplasmosis canina. La primera etapa del hallazgo hematológico (hematocrito, hemoglobina, recuento glóbulos rojos, recuento de leucocitos y frotices sanguíneos) y obtención del suero para su conservación fueron ejecutados en el Laboratorio Clínico “Pet Lab” (Lambayeque); y la segunda parte del hallazgo hematológico (recuento de plaquetas, valor relativo de leucocitos, visualización de corpúsculos de inclusión y/o mórulas) y examen serológico fueron realizados en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la FMV – UNMSM (Lima).

3.2 MATERIALES

3.2.1. INDIVIDUOS PARTICIPANTES

En el presente estudio se colectó un total de **88** muestras de sangre periférica venosa para la determinación del hallazgo hematológico y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. Dicho tamaño muestral fue establecido de acuerdo a la fórmula para poblaciones finitas:

$$n = \frac{NZ^2pq}{(N-1)E^2 + Z^2pq}$$

Dónde:

N = Total de la población

Z= Distribución normal (Z=1.96, a un nivel de confianza del 95%)

p = proporción esperada (p=0.06) (Badillo *et al.*, 2017)

q = 1 – p (1-0.06 = 0.94)

E = Margen de error permitido (5 %)

Para el cálculo estimado de la población de perros en el distrito de Chiclayo se consideró la relación habitante: perro de 10:1. De esta manera la población canina fue de aproximadamente 29,178 siendo el tamaño muestral de 87 perros como mínimo.

3.2.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los *criterios de inclusión* fueron todos los perros aparentemente sanos con antecedentes de mordeduras de garrapatas provenientes del distrito de Chiclayo con presencia de éstas o haber sido infestados dentro de los últimos 6 meses sin distinción de raza, sexo y edad.

Los *criterios de exclusión* fueron la ausencia de garrapatas por un periodo mayor a los 6 meses.

3.2.2 MATERIALES PARA TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS OBTENIDAS

- Mesa de aluminio
- Cooler con geles refrigerantes
- Tubos Vacutainer® con EDTA (ácido tetraacético de etilendiamino)
- Tubos Vacutainer® sin anticoagulante con separador de gel
- Gradillas para tubos Vacutainer®
- Plumón marcador
- Masking tape
- Agua oxigenada
- Guantes de látex
- Algodón hidrófilo

- Alcohol 70°
- Agujas hipodérmicas descartables de 21G x 1”

3.2.3. MATERIALES PARA PRUEBAS HEMATOLÓGICAS Y SEROLÓGICAS

3.2.3.1. EQUIPOS

- Microscopio de luz artificial – Leica DM500
- Fotómetro RIELE 5010_{v5+}
- Centrífuga para microcapilares
- Contador de células (para glóbulos rojos y blancos)
- Contador de células (diferenciador celular de glóbulos blancos)
- Congeladoras (T°= -20°C)

3.2.3.2. MATERIALES DE PLÁSTICO Y/O VIDRIO

- Microcapilares sin heparina (azul)
- Portaobjetos
- Mechero de alcohol
- Manguerillas de goma
- Tubos de ensayo
- Pipeta Shali
- Gradillas para tubos de ensayo
- Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
- Pipetas de Thoma para glóbulos blancos
- Cámaras de Neubauer
- Cubreobjetos
- Viales de plástico de 1.5 ml
- Caja de almacenamiento para viales
- Caja de almacenamiento de porta láminas
- Pipetas de Pasteur de plástico

3.2.3.3. SOLUCIONES Y/O REACTIVOS

- Cloruro de sodio al 0.85% (Dilutor de glóbulos rojos)

- Ácido clorhídrico al 1% (Dilutor de glóbulos blancos)
- Reactivo de Drabkin
- Agua destilada (Solución buffer)
- Colorante Wright
- Aceite de inmersión
- Test SNAP® 4Dx® Plus

3.2.3.4. OTROS

- Cronómetro
- Secadora de cabello
- Tabla de lectura para hematocrito (CRIPTOCAP)
- Contenedor de objetos punzocortantes
- Lápiz carboncillo
- Madera con canaletas para portabjeto
- Ficha de trabajo

3.3. MÉTODOS

3.3.1. TOMA DE MUESTRAS

Se colectó 2 muestras de sangre periférica venosa por cada de perro empleando en todo momento una adecuada sujeción para reducir el factor de estrés ocasionado por el manejo y practicando siempre las medidas de bioseguridad como el uso de guantes de látex. Se realizó una hemostasia proximal a la articulación del codo para visualizar la dilatación de la vena cefálica y tras ubicarla se limpió el área con alcohol al 70%. Luego se procedió a colocar una aguja hipodérmica estéril 21G x 1” y se obtuvo sangre usando el sistema de colección por goteo en el tubo de EDTA (tapa morada) llenándola unos 3ml aproximadamente para ser homogenizado con suaves movimientos circulares con el fin de evitar la formación de coágulos e inmediatamente se tomó otra muestra en un tubo sin EDTA (tapa amarilla) unos 5ml aproximadamente y se dejó en posición vertical. Concluida la toma de muestra, se colocó algodón seco sobre la zona de punción haciendo presión o cinta masking tape para evitar la salida continua de sangre.

Durante el transporte, las muestras fueron conservadas en el cooler que contenía geles refrigerantes para luego ser procesadas en el laboratorio.

3.3.2. ANÁLISIS HEMATOLÓGICO

Los procedimientos se realizaron dentro de las primeras 12 horas conservadas a 4°C para evitar falsos valores y alteraciones de la morfología celular producidos por el tiempo de conservación en EDTA. Se realizaron mediante protocolos establecidos por el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la FMV-UNMSM.

3.3.2.1. DETERMINACIÓN DEL HEMATOCRITO (%)

Se empleó microcapilares sin heparina (franja azul). Se llenó hasta las $\frac{3}{4}$ partes del microcapilar proveniente de la muestra de sangre con EDTA previamente homogenizada y se retiró con algodón el excedente de sangre de la parte externa del microcapilar manteniendo siempre la posición horizontal del mismo para evitar el vaciamiento de la muestra. Se realizó el sellado del microcapilar usando un mechero donde se quemó el extremo libre de sangre (donde se encuentra la franja azul) manteniendo siempre una posición horizontal y realizando giros suaves sobre la yema de los dedos sin que el fuego haga contacto con la sangre. Posteriormente una vez verificada el sellado se llevó el microcapilar a una centrífuga con el extremo del sello hacia la periferia del equipo y se colocó a una velocidad de 25200 g por 5 minutos. Finalmente se realizó la lectura del hematocrito de la muestra en base a una escala referencial para microcapilares CRIPTOCAP el cual es expresado en porcentajes.

3.3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA (g/dL)

Se realizó en base al método de la Cianometahemoglobina cuyo fundamento parte de la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina la cual a su vez pasa a cianometahemoglobina tras interactuar la sangre con el ferricianuro de potasio (Reactivo Drabkin). Este pigmento de cianometahemoglobina es cuantificado por espectrofotometría. Para su determinación se colocó 5ml de Reactivo de Drabkin en un tubo de 10 ml. Luego a partir de la muestra de sangre con EDTA se retiró 20µl utilizando la pipeta de Sahli que se encuentra conectada en el extremo posterior a una manguerilla de goma para una mejor manipulación (se homogenizó previamente). Posteriormente se depositó la sangre contenida en la pipeta de Sahli al tubo que contiene el Reactivo de Drabkin y se homogenizó la mezcla soplando la misma pipeta. Tras 10 minutos de espera se procedió a determinar la densidad óptica de la solución mediante el uso de

un espectrofotómetro. Éste se calibró a una longitud de onda de 546 nm con un factor de 37 y utilizando la opción CF (con factor). El mismo se llevó a 0 con 1 ml del Reactivo de Drabkin y posteriormente se realizó la lectura con 1 ml de la muestra problema, pulsando dos veces la tecla de resultado para finalmente obtener el resultado expresado en g/dl.

3.3.2.3. RECUENTO DE ERITROCITOS, LEUCOCITOS Y PLAQUETAS

En caso del recuento de eritrocitos y leucocitos se usó la pipeta de Thoma con una medida máxima de 101 y 11 μ l, respectivamente. En ambas pipetas, para una mejor manipulación, se conectó a su extremo posterior una manguera de goma pequeña y se aspiró 0.5 μ l de la muestra de sangre con EDTA. Se retiró con algodón el excedente de sangre de la parte externa de las pipetas manteniendo siempre la posición horizontal del mismo. Se completó la cantidad de cada pipeta (hasta las medidas señaladas) con sus respectivos dilutores. En caso de eritrocitos se empleó el CINA al 0.85% y para los leucocitos se utilizó el HCl al 1% obteniendo diluciones finales de 1:200 y 1:20, respectivamente. Se homogenizaron las pipetas con la ayuda de un agitador mecánico durante 30 a 40 segundos y se eliminó 3 gotas de ambas pipetas sobre un algodón para luego colocar 1 gota en uno de los lados de la cámara de Neubauer llenándolo por capilaridad. Se esperó 1 a 2 minutos para que sedimenten y puedan observarse con claridad para el conteo. El conteo de eritrocitos fue contabilizado, mediante un objetivo de 10X, los 4 cuadrantes de las esquinas y del centro, donde la suma se multiplicó por 10,000 expresándose como número de eritrocitos/ μ l de sangre. En caso de los leucocitos se contabilizaron mediante un objetivo de 40X los 4 cuadrantes correspondientes siendo la suma multiplicado por 50 cuyo resultado es expresado en número de glóbulos blancos/ μ l de sangre.

Para determinar el recuento diferencial de glóbulos blancos previo a ello se realizó un frotis sanguíneo a partir del microcapilar que fue utilizado en la determinación del hematocrito antes de ser sellado. Para la realización del frotis se colocó una gota de sangre sobre una lámina portaobjetos nuevo y con ayuda de otra lámina portaobjeto se utilizó uno de sus bordes ubicándolo delante de la gota de sangre formando un ángulo aproximado de 30°- 45° con respecto a la superficie de la primera lámina (se forma un ángulo menor si la consistencia es más acuosa y un ángulo mayor si la sangre es espesa) se deslizó con un movimiento corto y rápido hacia el otro extremo del primer portaobjetos con el fin de conseguir una película fina de sangre homogéneamente distribuida. Se secó el frotis con la ayuda de una secadora de cabello y se rotuló con el código del paciente en uno de los bordes inferiores con un lápiz carboncillo para su posterior tinción.

Para la tinción, se vertió el colorante Wright con una pipeta Pasteur de plástico sobre el frotis cubriéndose completamente y se dejó en reposo por 3 a 4 minutos. Luego se agregó 10 a 12 gotas de buffer (agua destilada) homogenizando la mezcla tras soplar suavemente con ayuda de una manguerilla de goma sobre la lámina hasta observar una película metálica sobre la mezcla y se dejó en reposo por 6 minutos. Se lavó la lámina con agua potable a chorro lento para eliminar el excedente de mezcla. Se dejó secar la lámina teñida colocándolo de manera vertical en una superficie de madera con canaletas para posteriormente realizar la visualización microscópica de las células en el frotis sanguíneo. Sobre la lámina coloreada se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó inicialmente con objetivos de 10X y 40X para determinar la distribución celular y poder escoger una zona adecuada de la monocapa para iniciar el recuento diferencial. Se inició la diferenciación celular con un objetivo de donde se contabilizó 100 células leucocitarias con el contador de diferenciador celular para así obtener los valores relativos (porcentuales) de cada línea celular y posteriormente calcular los valores absolutos de cada línea leucocitaria en base al conteo general de leucocitos.

Para la determinación del recuento de plaquetas se realizó a partir del análisis microscópico del frotis sanguíneo obtenido con tinción Wright. Se procedió a contabilizar la cantidad de plaquetas halladas en 10 campos bajo un objetivo de 100X y se dividió entre 10 (número de plaquetas promedio por campo). Finalmente, ese valor fue multiplicado por un factor de corrección de 15000 expresando el resultado final como número de plaquetas/ μ l.

3.3.3. VISUALIZACIÓN DE CORPÚSCULOS DE INCLUSIÓN (CI) O MÓRULAS

La visualización se realizó bajo un objetivo de 100X con tinción Wright. Para la identificación de CI o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp. en el frotis sanguíneo, se revisó con énfasis la monocapa, bordes y cola del frotis buscando estructuras compatibles a nivel intracelular en granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) y en plaquetas en caso de sospecha de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, respectivamente. Las láminas fueron revisadas dos veces.

De acuerdo a los **hallazgos hematológicos** se consideró como perros **positivos** aquellos que presentaron trombocitopenias con corpúsculos de inclusión (CI) o mórulas; **sospechosos**, aquellos que presentaron solamente CI o mórulas sin trombocitopenia y **negativos**, aquellos que no presentaron trombocitopenia ni CI o mórulas.

3.3.4. ANÁLISIS SEROLÓGICO

Se trabajó con 88 muestras de sangre contenidas en los tubos sin EDTA (tapa amarilla) que posee un gel separador del suero frente al componente celular sanguíneo. Una vez obtenido los sueros, se conservaron en viales a -20°C para ser procesados con el Test SNAP® 4Dx® Plus en Lima.

Para el uso del Test SNAP® 4Dx® Plus, las muestras se dejaron a temperatura ambiente entre 15°C-25°C, una vez que se llegó a esa temperatura se procedió a colocar en un tubo de muestra desechable 3 gotas de muestra y 4 gotas del conjugado, luego se invirtió con cuidado 4 ó 5 veces para mezclarlo. Posteriormente se invirtió todo el contenido del tubo de muestra en el pocillo de muestra del dispositivo SNAP y se esperó que el color apareciese en el círculo de activación para pulsar firmemente con ayuda de los dedos pulgares (activándolo) escuchándose un “click”. Luego se procedió a la lectura del resultado a los 8 minutos comparándolos con los puntos controles positivos y negativos para la lectura (IDEXX Laboratories, 2018).

En la **detección de anticuerpos** contra *Anaplasma* spp. permitió identificar perros con resultados **seropositivos** (presencia de anticuerpos) y **seronegativos** (ausencia de anticuerpos detectables).

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Se empleó cuadros de estadística descriptiva utilizando frecuencias e intervalos de confianza (IC) de los datos obtenidos de la hematología y serología para la detección de Anaplasmosis canina con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque – Perú).

IV. RESULTADOS

Del total de 88 perros con antecedentes de garrapatas, el 48.86% (43/88) presentaron trombocitopenia $<200 \times 10^3/\mu\text{l}$. Del total de perros trombocitopénicos el 55.81% (24/43), 41.86% (18/43) y 2.33% (1/43) fueron clasificados, respectivamente, como una trombocitopenia leve ($150 - 199 \times 10^3/\mu\text{l}$), moderada ($50 - 149 \times 10^3/\mu\text{l}$) y severa ($<50 \times 10^3/\mu\text{l}$). Se tomó como referencia la clasificación realizada por Eiras *et al.* (2013) y rangos del Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la FMV-UNMSM.

El 4.55% (4/88) de perros con antecedentes de garrapatas evidenciaron CI o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp. Éstas se presentaron únicamente al interior de plaquetas siendo compatibles con *A. platys* (Figura 1a, 1b y 1c). No se hallaron CI o mórulas en granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) compatibles con *A. phagocytophilum*. Por otro lado, el 34.09% (30/88) de perros evidenciaron CI o mórulas en linfocitos siendo compatibles con *E. canis* (Figura 2) incluidas los cuatro perros que fueron compatibles con *A. platys* (Apéndice 2).

A partir de los resultados de perros que presentaron mórulas en plaquetas compatibles con *Anaplasma platys* más trombocitopenia permitieron determinar Anaplasmosis canina en el 2.27% (2/88) de perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú). Además, el 2.27% (2/88) resultaron ser sospechosos por presentar solamente mórulas sin evidencia de trombocitopenia.

De los dos perros (C10 y C46) clasificados como positivos al hallazgo hematológico, se analizaron la serie eritrocítica, trombocítica y leucocítica. No se evidenció anemia; sin embargo, el C10 presentaba leucocitosis ($20.05 \times 10^3/\mu\text{l}$) con neutrofilia ($14.24 \times 10^3/\mu\text{l}$) y linfocitosis ($5.01 \times 10^3/\mu\text{l}$); mientras que el C46 manifestaba leucopenia ($7.4 \times 10^3/\mu\text{l}$) y neutropenia ($5.18 \times 10^3/\mu\text{l}$). En cuanto a la serie trombocítica ambos resultados (129 y $139.50 \times 10^3/\mu\text{l}$,

respectivamente) fueron clasificados como moderada trombocitopenia. Por otro lado, otros dos perros (C44 y C70) resultaron ser sospechosos evidenciando una leve anemia (Apéndice 2).

En la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp., en perros con antecedentes de garrapatas, usando el Test SNAP® 4Dx® Plus se obtuvo como resultado una seropositividad del 22.73% (20/88) (Apéndice 3). Los dos perros positivos al hallazgo hematológico (evidencia de mórulas compatibles con *A. platys* mas trombocitopenia) fueron a la vez seropositivos.

En la hematología de los 20 perros seropositivos a *Anaplasma* spp., todos presentaron alguna alteración hematológica siendo de mayor a menor frecuencia una trombocitopenia 60% (12/20), anemia 55% (11/20), leucocitosis 30% (6/20) y leucopenia 15% (3/20) (Cuadro 1). En cuanto a la presentación de las alteraciones hematológicas, siendo únicas o múltiples, se determinó que las presentaciones de mayor frecuencia fueron solo trombocitopenia 25% (5/20), solo anemia 20% (4/20) y anemia con leucocitosis 15% (3/20).

En la detección de anticuerpos contra diferentes agentes transmitidos por garrapatas como *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp y *B. burgdorferi* que ofrece el Test SNAP® 4Dx® Plus en los 88 perros con antecedentes de garrapatas (Cuadro 2), se obtuvo como resultado que solo el 48.86% (43/88) mostraron seropositividad única contra *Ehrlichia* spp. y el 1.14% (1/88) única contra *Anaplasma* spp.; mientras que la única seropositividad múltiple fue *Anaplasma* spp. con *Ehrlichia* spp. llegando al 21.59% (19/88) (Figura 3). No se logró evidenciar anticuerpos contra *B. burgdorferi*.

Finalmente al evaluar los hallazgos hematológicos y serológicos en los 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú) se encontró que el 2.27% (2/88) fueron positivos y seropositivos; el 1.14% (1/88) fue sospechoso y seropositivo; el 1.14% (1/88) fue sospechoso y seronegativo; el 19.32% (17/88) fueron negativos y seropositivos; y por último, el 76.14% (67/88) fueron negativos y seronegativos (Cuadro 3).

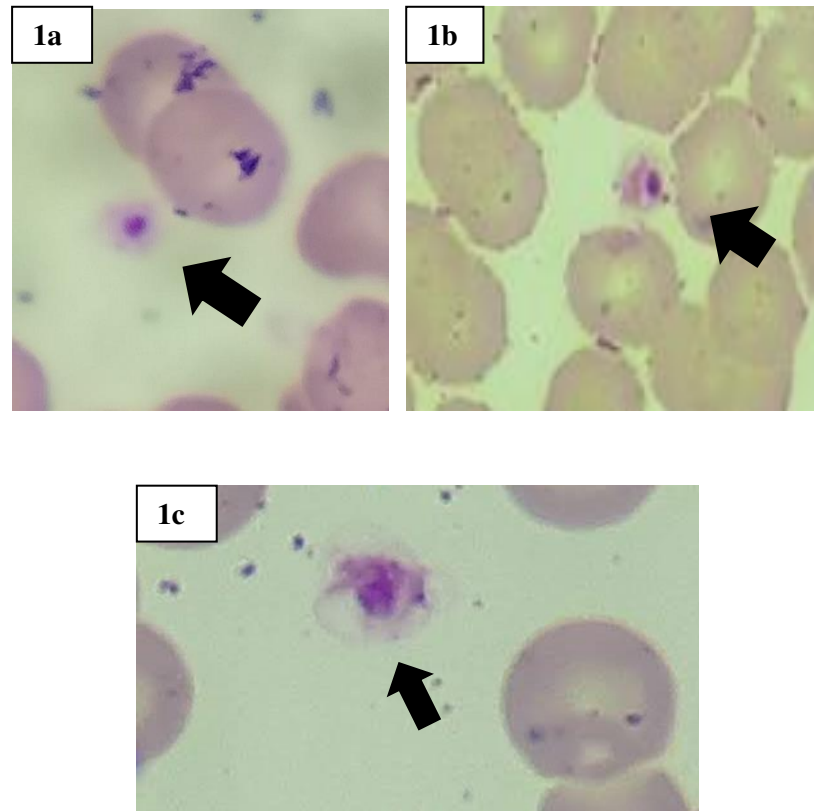


Figura 1. Frotis sanguíneos con mórulas al interior de plaquetas circulantes compatibles con *A. platys* (1a, 1b y 1c). Tinción Wright (1000x)



Figura 2. Frotis sanguíneo con dos mórulas al interior del linfocito compatibles con *Ehrlichia canis*. Tinción Wright (1000x)



Figura 3. Resultado seropositivo a *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. usando el Test SNAP® 4Dx® Plus

Cuadro 1. Alteraciones hematológicas halladas en los 20 perros seropositivos con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS	SEROPOSITIVOS		
	N	%	IC 95% ¹
Trombocitopenia	12	60	(0.39 – 0.81)
Anemia	11	55	(0.33 – 0.77)
Leucocitosis	6	30	(0.10 – 0.50)
Leucopenia	3	15	(0 – 0.31)

¹ Intervalo de confianza

Cuadro 2. Frecuencia de seropositividad única y múltiple mediante el Test SNAP® 4Dx® Plus de 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

AGENTE	n	%	IC 95% ¹
<i>Anaplasma</i> spp.	1	1.14	(0 - 0.03)
<i>Ehrlichia</i> spp.	43	48.86	(0.38 - 0.59)
<i>Anaplasma</i> spp. y <i>Ehrlichia</i> spp.	19	21.59	(0.13 - 0.30)
N.A ²	25	28.41	0

¹ Intervalo de confianza

²N.A= Ningún agente

Cuadro 3. Resumen general de los hallazgos hematológicos y serológicos de 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

HALLAZGO HEMATOLÓGICO	SEROLOGÍA		TOTAL
	Seropositivo	Seronegativo	
Positivo	2 (2.27%)	0 (0%)	2 (2.27%)
Sospechoso	1 (1.14%)	1 (1.14%)	2 (2.27%)
Negativo	17 (19.32%)	67 (76.14%)	84 (95.45%)
TOTAL	20 (22.73%)	68 (77.27%)	88 (100)

V. DISCUSIÓN

La Anaplasmosis canina es una enfermedad emergente con distribución mundial causada por *A. phagocytophilum* y *A. platys* que son transmitidas por la mordedura de garrapatas (Dumler *et al.*, 2001). La distribución y prevalencia de cada agente varía de acuerdo al género del vector que habita en un determinado territorio (Dumler *et al.*, 2001; Sainz *et al.*, 2015).

En Lambayeque, ciudad de Chiclayo, la garrapata más frecuente en perros identificada morfológica y molecularmente es el *R. sanguineus* (Oliva, 2015; Cervantes, 2018); asimismo, en Cusco, Lima, Tumbes y Trujillo (Escalante, 1981; Nunton *et al.*, 2013; Córdova, 2016; Huamán y Jara, 2017). Por el contrario, en Piura y Amazonas ha sido reportado las del género *Ixodes* spp. (Glenny *et al.*, 2004). Las garrapatas son vectores que transmiten muchas enfermedades incluyendo infecciones bacterianas y virales y muchas de éstas con potencial zoonótico. Las coinfecciones pueden agravar la enfermedad clínica y hallazgos de laboratorio (Sainz *et al.*, 2015).

Actualmente, el diagnóstico de esta enfermedad resulta ser desafiante porque la presentación más frecuente es de tipo subclínica presentando alteraciones hematológicas además del hallazgo accidental de CI o mórulas en granulocitos y plaquetas compatibles con *Anaplasma* spp. (Dahmani *et al.*, 2015).

El hemograma más la citología de frotis sanguíneo, es el primer examen básico y de rutina que aporta mucha información del estado del paciente; más aún, en casos subclínicos de la enfermedad (animales aparentemente sanos) donde exista exposición a garrapatas pudiéndose encontrar alteraciones hematológicas siendo la más reportada la trombocitopenia y en segundo lugar la anemia (Brown *et al.*, 2006; Bouzouraa *et al.*, 2016; Day, 2016; Chirek *et al.*, 2018). Muchas clínicas ahora cuentan con equipos automatizados para realizar la hematología dejando a un lado la realización y evaluación del frotis sanguíneo subdiagnosticando la enfermedad.

El 48.86% (43/88) de perros fueron trombocitopénicos de las cuales solo en dos individuos se hallaron mórulas en plaquetas compatibles con *A. platys*. Estudios realizados por Santos *et al.* (2009) mediante pruebas moleculares hallaron que el 94.4% (17/18) de perros positivos a *Babesia* spp., el 81.8% (27/33) de perros positivos a *A. platys* y 66.3% (57/86) de perros positivos a *E. canis* fueron trombocitopénicos. Esto demuestra que la trombocitopenia es una alteración hematológica compartida por otras enfermedades transmitidas por vectores como la Erliquiosis y Babesiosis canina que son muy frecuentes en nuestro medio; por lo tanto, por sí solo no aporta un diagnóstico certero, sino que requiere de otras pruebas que sustenten al diagnóstico.

La baja frecuencia de 4.55% (4/88) de perros aparentemente sanos que presentaron CI o mórulas compatibles con *A. platys* puede relacionarse con la sensibilidad de la técnica. Dependiendo de la etapa de la enfermedad en la que se encuentre, existe mayor sensibilidad al inicio o durante la manifestación de los signos clínicos (Greene, 2012; Eiras *et al.*, 2013; Day, 2016). En casos crónicos la sensibilidad disminuye drásticamente por la baja bacteriemia; sin embargo, se ha reportado inclusiones ocasionales compatibles con *A. platys* hasta 21 meses post inoculación en infecciones experimentales (Kontos *et al.*, 1991).

En el presente trabajo, la ausencia de CI o mórulas compatibles con *A. phagocytophilum* en granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) no descarta la infección. En un estudio experimental en perros infectados por *A. phagocytophilum* las mórulas han sido detectadas al interior de neutrófilos a los 4 a 14 días postinfección (Lilliehook *et al.*, 1998). Es decir, que en infecciones recientes tienen una ventana de hasta 14 días en las cuales no se evidenciarían las mórulas. Además; estudios realizados por Tateishi *et al.* (2015), en Lima, encontraron que el 1.39% (2/144) de perros con signos clínicos a la enfermedad presentaron mórulas en neutrófilos compatibles con *A. phagocytophilum*; incluso, en unos de esos casos mostró seropositividad contra *Anaplasma* spp. mediante el Test SNAP® 4Dx®; sin embargo, no se realizó la confirmación mediante pruebas moleculares. Este caso probablemente evidencia una infección compatible con *A. phagocytophilum* en la etapa aguda de la enfermedad. Por otro lado, en la provincia de Chiclayo (Lambayeque - Perú), se halló CI o mórulas en neutrófilos compatibles con *A. phagocytophilum* en 9% (9/100) de caballos aparentemente sanos (Masgo, 2018) demostrando que es posible observarlas a la evaluación del frotis sanguíneo en animales asintomáticos; sin embargo, en el presente estudio realizado en perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas no se evidenció.

Según Dumler *et al.* (2005), *A. phagocytophilum* tiene mayor afinidad por los neutrófilos de humanos, caballos y perros; siendo esto alarmante en la Provincia de Chiclayo, ya que se ha observado que muchas haras de caballos tienen perros guardianes pudiendo, en algún momento, ser mordidos por el mismo vector infectándose con el agente, incluso transmitirse a los seres humanos que están al cuidado de estos animales. Existen muchos reportes de detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en personas que han estado en contacto con perros infectados (Abarca *et al.*, 2008; Arraga-Alvarado *et al.*, 2014; Khatat *et al.*, 2017; Weinborn *et al.*, 2018). Cabe mencionar que las mórulas en neutrófilos son indistinguibles de *E. ewingii* (Greib y Armstrong, 2006) y la presencia de esta bacteria, en nuestro país, resulta ser probable por las garrapatas del género *Amblyomma* spp. y *R. sanguineus* que ya han sido reportados en perros, animales domésticos y salvajes (Dale, 1977; Oliva, 2015; Cervantes, 2018).

Los CI o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp. por sí solas no proporcionan un diagnóstico definitivo, es por ello, que se debe de complementar con un hemograma para encontrar alteraciones hematológicas sugerentes de Anaplasmosis. El presente estudio consideró como positivos a perros trombocitopénicos con visualización de CI o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp.; sospechosos, no trombocitopénicos con CI o mórulas; y negativos, no trombocitopénicos ni CI o mórulas teniendo como resultado que el 2.27% (2/88) de perros fueron clasificados como positivos, el 2.27% (2/88) sospechosos y 95.46% (84/88) negativos; además, esta Anaplasmosis canina es sugerente a infecciones por *A. platys* por la visualización de mórulas al interior de plaquetas. Este resultado evidencia por primera vez, la Trombocitopenia Cíclica infecciosa canina (TCIC) mediante el hallazgo hematológico en perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú).

En Japón, el 16.7% de perros vagabundos confirmados por PCR para *A. platys* presentaron mórulas al interior de plaquetas (Inokuma *et al.*, 2002); mientras, que en Australia, el 9.43% (5/53) de caninos aparentemente sanos presentaron inclusiones basófilas en plaquetas compatibles con *A. platys*, siendo los 53 perros positivos a PCR (Brown *et al.*, 2006). Esto muestra que es posible evidenciar CI o mórulas compatibles con el agente en perros asintomáticos.

Los CI o mórulas formadas por esta bacteria al interior de plaquetas, en sangre periférica suelen ser bajas como intermitente debido a los episodios cíclicos que caracteriza la enfermedad. Generalmente se hallan en la primera trombocitopenia y suele ser dificultoso en etapas crónicas (Harvey *et al.*, 1978; French y Harvey, 1983) aunque en infecciones

experimentales se ha reportado su visualización hasta los 21 meses postinoculación (Kontos *et al.*, 1991) es por ello que la ausencia de las mórulas o corpúsculos de inclusión no descarta la infección, más aún si se evidencia alteraciones compatibles por *A. platys*.

En infecciones por *A. Platys* donde se evidencian CI o mórulas, generalmente involucran al 1% de plaquetas (Day, 2016). En casos agudos, Kontos *et al.* (1991) reportaron en perros diagnosticados serológicamente (IFA) hasta un 72% mientras que, en otro estudio, de tipo experimental, realizado por Arraga-Alvarado *et al.* (1997) llegaron hasta un 97% de plaquetas infectadas; más adelante Inokuma *et al.* (2002) hallaron hasta un 5% en perros vagabundos. Además, existe evidencia que *A. Platys* infecta a las células precursoras de plaquetas (De Tommasi *et al.*, 2014).

El hallazgo de CI o mórulas al interior de plaquetas no son suficientes porque suelen confundirse con estructuras granulares, remanentes nucleares en plaquetas o precipitados de la tinción pudiendo dar un falso diagnóstico. Esto depende de la habilidad y experiencia del operario (Dyachenko *et al.*, 2012; Greene, 2012). Otros estudios sustentan que podrían ser del resultado de un cuadro inflamatorio que desencadena en una activación plaquetaria por la liberación de mediadores solubles originando la formación de gránulos localizados en la zona central de la plaqueta siendo comprimidos por una red circundante de microtúbulos y microfilamentos a manera de falso núcleo semejante a los CI o mórula (Ferreira *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2009; Greene, 2012).

El 2.27% (2/88) de perros resultaron ser sospechosos a infecciones por *A. platys* donde presentaron los CI o mórulas al interior de plaquetas, pero no presentaron trombocitopenia. Esto podría explicarse por la trombocitopenia de tipo cíclica que caracteriza a la enfermedad donde persiste durante 7 a 14 días, seguida de un corto periodo de recuperación, durante el cual el recuento plaquetario vuelve a la normalidad (Harvey *et al.*, 1978; Gaunt *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en 114 perros, el 15.79% (18/114) resultaron ser positivas por PCR para *A. platys* y con la finalidad de relacionar la evidencia de CI o mórulas compatibles con la alteración hematológica más frecuente, fueron clasificados en 5 grupos: G1) evidencia en frotis sin trombocitopenia, G2) evidencia en frotis con trombocitopenia grave, G3) sin evidencia en frotis con severa trombocitopenia, G4) sin evidencia en frotis con moderada trombocitopenia y G5) sin evidencia en frotis ni trombocitopenia concluyendo que de esos 18 positivos, el 44.44% (8/18), 27.78% (5/18), 16% (3/18), 11.1% (2/18) y 0% (0/18) de los positivos pertenecieron al grupo G3, G2, G1, G4, y G5, respectivamente (Eiras *et al.*, 2013). Esto muestra que perros

únicamente con severa trombocitopenia también deberían considerarse sospechosos de la enfermedad; sin embargo, la trombocitopenia por sí solo puede implicar muchas otras causas ajenas a la infección por *Anaplasma* spp.

De los dos únicos perros que fueron positivos al hallazgo hematológico (C10 y C46) (trombocitopénicos más evidencia de CI o mórulas) ambos tenían una moderada trombocitopenia, más no anemia. En cuanto a la serie leucocítica, el C10 presentó leucocitosis ($20.05 \times 10^3/\mu\text{l}$), neutrofilia ($14.24 \times 10^3/\mu\text{l}$) y linfocitosis ($5.01 \times 10^3/\mu\text{l}$); mientras que el C46 manifestaba leucopenia ($7.4 \times 10^3/\mu\text{l}$) y neutropenia ($5.18 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Apéndice 2). Estos resultados coinciden con los reportados en infecciones causadas por *A. platys* (Woody y Hoskins, 1991; Bouzouraa *et al.*, 2016). Por otro lado, los otros 2 perros que resultaron ser sospechosos (C44 y C70) (evidencia únicamente de CI o mórulas) solo presentaron una leve anemia, cabe mencionar que la anemia es la segunda alteración más reportada en casos de Anaplasmosis (Bouzouraa *et al.*, 2016; Yancey *et al.*, 2017; Chirek *et al.*, 2018).

En infecciones por *A. platys*, la presencia de trombocitopenia se debe a diversas causas tales como fagocitosis plaquetaria, disminución en la producción de plaquetas al verse alterados los megacariocitos; y destrucción inmunomediada (Harvey *et al.*, 1978; Gaunt *et al.*, 2010; De Tommasi *et al.*, 2014).

En infecciones por *A. platys* las hemorragias son poco frecuente debido a la corta duración de la trombocitopenia donde normalmente oscila en 2 a 3 días (Harvey *et al.*, 1978) e incluso en infecciones experimentales (Brown *et al.*, 2001; Gaunt *et al.*, 2010) además no llega a generar una vasculitis significativa como se ha reportado en casos de *E. canis* siendo más severa la hemorragia (Baker *et al.*, 1987). Se ha reportado caninos muy trombocitopénicos ($<20 \times 10^3/\mu\text{L}$) que se encuentran aparentemente sanos sin evidencia de hemorragias (Ulutas *et al.*, 2007).

La trombocitopenia por sí sola no es patognomónico de la enfermedad ya que hay otras causas que pueden dar esta alteración, por ejemplo, el uso del anticoagulante ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) puede provocar aglutinación de plaquetas y satelismo plaquetario alrededor de polimorfonucleares causando una pseudotrombocitopenia; una trombocitopenia inducida por fármacos (cefalosporina, cloranfenicol, penicilinas, trimetropim-sulfametoxazol, fenobarbital, etc); alteraciones a nivel de la médula ósea; infecciones víricas como parvovirus canina; enfermedades hereditarias; vasculitis; entre otros (Nelson y Couto, 2014); por ello, se debe realizar una correcta anamnesis para realizar un diagnóstico diferencial y complementarlo con otros exámenes laboratoriales.

Del presente estudio, el 22.73% de perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas resultaron ser seropositivos en el distrito de Chiclayo siendo menor en comparación a lo reportado por Delgado y Montoya (2018) quienes hallaron una seropositividad del 34.62%, a través del kit Vet Scan Anaplasma Rapid Test, en perros con signos clínicos compatibles con la enfermedad del mismo lugar de estudio. Además, éste último estudio muestra que en los distritos aledaños como José Leonardo Ortiz y La Victoria presentaron una seropositividad del 57.7% y 73.08%, respectivamente. Esto es alarmante porque evidencia que hay mayor exposición de *Anaplasma* spp. en los perros de Chiclayo (Perú) con respecto a otros estudios realizados en Piura en perros con signos clínicos e historial de garrapatas con un 4.2% (3/71) (Naranjo, 2018). En el estudio realizado en Piura, se esperaba encontrar más casos de perros seropositivos en animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad, más aún si se ha reportado en perros garrapatas del género *Ixodes* spp. y *R. sanguineus* (Glenny *et al.*, 2004), habiendo mayor exposición frente *Anaplasma* spp. Una hipótesis es que en el trabajo presentado por Naranjo (2018), esos perros se encontraban al inicio de la fase aguda de la enfermedad donde aún no había anticuerpos detectables o que en esa zona la distribución de *Anaplasma* spp. es baja. La visualización de CI o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp. habrían confirmado esta hipótesis.

Un resultado seropositivo puede significar que han sido expuestos anteriormente a la infección y superaron la enfermedad manteniendo los anticuerpos en sangre o quizás represente una infección activa. Cabe mencionar que 2 perros seropositivos (2/20) fueron positivos al hallazgo hematológico presentando mórulas compatibles con *A. platys* como trombocitopenia (Cuadro 3). Por otro lado, un resultado seronegativo puede indicar que no presentan anticuerpos contra *Anaplasma* spp. porque nunca estuvieron expuestos al agente, o aún los anticuerpos no son detectables por la prueba ya que se encuentran en el periodo de incubación o en la primera etapa de la enfermedad aguda cuando las cargas bacterianas son bajas (en caso de una infección presente) (Sainz *et al.*, 2015).

Diversos estudios realizados en países vecinos en cuanto a la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros mediante el test SNAP® 4Dx®, hallaron una seroprevalencia del 43.7% (35/80) en perros de dos comunas en Chile (Álvarez *et al.*, 2015); 33% (161/498) en perros sanos y enfermos en Colombia (McCow *et al.*, 2015); y 53.8% (38/80) en perros de barrios rurales en Ecuador (Peñaloza, 2015) siendo mayores a los hallados en el presente estudio. Un resultado serológico para *Anaplasma* spp., depende de muchos factores intrínsecos y extrínsecos como en la etapa de la enfermedad que se encuentra, el sistema inmunológico del

perro, la distribución de *Anaplasma* spp. en cada territorio, la exposición a garrapatas *R. sanguineus* e *Ixodes* spp., entre otros.

En infecciones experimentales en perros con *A. phagocytophilum* se ha detectado anticuerpos (IgG) 8 días después de la exposición inicial y de 2 a 5 días después de la visualización de mórulas en neutrófilos (Egenvall *et al.*, 2000) y mediante IFA en el día 14 (Moroff *et al.*, 2014); a diferencia de infecciones naturales con *A. phagocytophilum* donde fueron detectados tardíamente al día 30 mediante el test SNAP® 4Dx® (Yancey *et al.*, 2017). Por otro lado, en infecciones con *A. platys*, se detectaron anticuerpos mediante el test SNAP® 4Dx® al día 16 postinfección (Gaunt *et al.*, 2010). Cabe mencionar que existe reacción cruzada entre *A. phagocytophilum* y *A. platys* (Sainz *et al.*, 2015).

En cuanto a la duración de anticuerpos detectables en el perro post infección es variable pudiendo durar de meses a años. En estudios experimentales con *A. platys* detectaron títulos de anticuerpos, mediante IFA, hasta el día 171 postinoculación (Kontos *et al.*, 1991) y mediante el test SNAP® 4Dx® usando la densitometría hasta el día 410 (Gaunt *et al.*, 2010) que duraron tales investigaciones. En infecciones naturales con *A. phagocytophilum* se detectaron anticuerpos hasta los 36 meses mediante el test SNAP® 4Dx® (Eberts *et al.*, 2011).

En la evaluación de la serie eritrocítica, trombocítica y leucocítica en los 20 perros seropositivos contra *Anaplasma* spp. se encontró que todos presentaron alguna alteración hematológica siendo las más frecuentes la trombocitopenia 60% (12/20), anemia 55% (11/20), leucocitosis 30% (6/20) y leucopenia 15% (3/20) (Cuadro 1); similares a los reportados por Naranjo (2018) en caninos seropositivos con signos compatibles a la enfermedad con antecedentes de garrapatas. Además, se determinó las alteraciones hematológicas únicas y múltiples, cuyos resultados fueron únicamente trombocitopenia 25% (5/20), únicamente anemia 20% (4/20) y anemia con leucocitosis 15% (3/20). Estas alteraciones hematológicas en perros con antecedentes de garrapatas son compatibles con infecciones de *Anaplasma* spp. y otras enfermedades como Erliquiosis, Babesiosis (Bouzouraa *et al.*, 2016; Chirek *et al.*, 2018) y su diagnóstico diferencial es importante para iniciar el tratamiento correcto, más aún si son animales clínicamente sanos porque seguirían siendo portadores del agente o podrían terminar en cuadros crónicos empeorando el pronóstico de la enfermedad.

El 21.59% (19/88) de perros mostraron seropositividad múltiple entre *Anaplasma* spp. con *Ehrlichia* spp. Esto se debe a que la *Ehrlichia canis* y el *R. sanguineus* tienen mayor prevalencia que afecta a perros en la ciudad de Chiclayo (Oliva, 2015; Cervantes, 2018). En el

presente estudio se detectó anticuerpos contra *Ehrlichia* spp. en el 70.45% (62/88) confirmando los estudios anteriores mencionados.

Muchos casos de seropositividad múltiple entre *A. platys* con *E. canis* han sido descritos. El 21.59% (19/88) de caninos que presentaron anticuerpos contra *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. fue menor frente al 30.1% (150/498) hallados en Colombia (Mc Cown *et al.*, 2015). Al contrario de Chile con 3.75% (Álvarez *et al.*, 2015) y en Perú, Piura con 4.2% (3/71) Naranjo (2018).

Al relacionar los hallazgos hematológicos (positivos, sospechosos y negativos) y serológicos para *Anaplasma* spp. en los 88 perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque – Perú). Se encontraron cinco casos: 1) perros positivos y seropositivos, 2) perro sospechoso y seropositivo, 3) perro sospechoso y seronegativo, 4) perros negativos y seropositivos y 5) perros negativos y seronegativos (Cuadro 3). La forma de interpretar los exámenes hematológicos y serológicos determinará el paso a seguir en cuanto al tratamiento y seguimiento en un animal aparentemente sano. Por ejemplo, en el presente trabajo los perros positivos al hallazgo hematológico fueron también seropositivos indicando Anaplasmosis de tipo subclínica; por lo tanto, se debería iniciar prontamente el tratamiento porque además se observaron alteraciones hematológicas, visualización de mórulas en linfocitos compatibles con *Ehrlichia canis* y anticuerpos frente a *Ehrlichia* spp. mostrando una coinfección (Apéndice 2 y 3). En este caso, un tratamiento con doxiciclina a 10mg/kg durante 28 días sería necesario. En los casos de perros sospechosos (sin trombocitopenia con CI o mórulas) el tratamiento debería de instaurarse seguidos de hemograma más evaluación de los frotis sanguíneos durante cada semana para determinar la duración del tratamiento; sin embargo, eso depende del criterio Médico veterinario tratante.

VI. CONCLUSIONES

- El 2.27% de perros con antecedentes de garrapatas presenciaron mórulas compatibles con *A. platys* acompañado de trombocitopenia.
- El 22.73% de perros con antecedentes de garrapatas fueron seropositivos a *Anaplasma* spp.
- Las alteraciones hematológicas más frecuentes en perros seropositivos fueron trombocitopenia, anemia y leucocitosis.
- El 21.59% de perros con antecedentes de garrapatas presentó una seropositividad múltiple contra *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp.

VII. RECOMENDACIONES

- En la clínica diaria de Medicina Veterinaria, en una consulta de un nuevo paciente que haya tenido antecedentes de garrapatas a pesar de que clínicamente esté sano, se debe realizar un hemograma que incluya el examen de frotis sanguíneo y si se observa algún hallazgo hematológico (trombocitopenia, anemia, leucocitosis y CI o mórulas) se debe complementar con pruebas serológicas confirmando aún más el diagnóstico dándonos sustento para iniciar el tratamiento. En caso de no evidenciarse nada, repetir el hemograma y serología a los 15 días.
- Es fundamental el seguimiento y los controles periódicos en perros con antecedentes de garrapatas como la concientización e importancia del control de ectoparásitos desde la consulta ya que repercute en la Salud Pública y Animal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Abarca K, Gárate D, López J, Acosta-Jamett G. 2016.** Flea and ticks species from dogs in urban and rural areas in four districts in Chile. Arch Med Vet 48: 247-253.
2. **Abarca K, López J, González P, Dabanch J, Torres M, Solari V, Perret C. 2008.** Evidencia seroepidemiológica de la exposición humana a *Anaplasma* spp. en Santiago, Chile. Rev Chil Infect 25(5): 197-200.
3. **Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, Valiente - Chevarría F, León U, Gutjahr C, Azócar T. 2007.** *Anaplasma platys* in dogs, Chile. Emerg Infect Dis 13: 1392-1395.
4. **Ábrego L, Dolz G, Romero J, Vargas B, Meneses A. 2009.** Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica. Cienc Vet 27(2): 71-80.
5. **Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna MP, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. 2005.** Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol 71(10): 6418-6422.
6. **Alleman R. 2017.** España: Vetebooks. [Internet]. [10 enero 2018]. Disponible en: https://vetebooks.s3.amazonaws.com/uploads/book/file/526/HEMOPARASITOS_Y_VECTORES_Neutro_1_.pdf
7. **Almazán C, González VH, Fernández IG, Cabezas A, Rodríguez R, De la Fuente J. 2016.** Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *E. canis* in dog Mexico. Ticks Tick-borne Dis 7(2): 276-283.

8. **Álvarez KA. 2015.** Detección serológica de agentes de la familia Anaplasmataceae en perros de las comunas de Puchuncaví y Quintero, región de Valparaíso, Chile. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia: Univ. Austral de Chile. 24p.
9. **Arraga-Alvarado C, Montero-Ojeda M, Bernardoni A, Anderson BE, Parra O. 1996.** Human ehrlichiosis: report of the first case in Venezuela. *Inves Clin* 37(1): 35-49.
10. **Arraga-Alvarado C, Palmar M, Parra O, Salas P. 2003.** *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: An Estructural Study of Experimental and Natural Infections. *Vet Pathol* 40:149-156.
11. **Arraga- Alvarado C, Parra O, Palmar RE, Chango-Alvarado MC. 1997.** *Ehrlichia platys*: Preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. *Revista Científica FCV-LUZ* 7(2): 99-109.
12. **Arraga-Alvarado C, Qurollo BA, Parra O, Berrueta MA, Hegarty BC, Breitschwerdt B. 2014.** Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 91(6): 1161-1165.
13. **Badillo VM, Díaz PA, Orozco SC, Lavalle GA. 2017.** Infection by *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* sp. In dogs attenden in veterinary clinics, Barranquilla, Colombia. *Rev. MVZ. Córdoba* 22 (Supl): 6023-6033.
14. **Baker DC, Simpson M, Gaunt SD, Corstvet RE. 1987.** Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. *Vet Pathol* 24: 449-453.
15. **Baker DC, Gaunt SD, Babin SS. 1988.** Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res* 49 (7): 1014-1016.
16. **Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. 1994.** Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging?. *JAMA* 272(3): 212-218.
17. **Baldridge GD, Scoles GA, Burkhardt NY, Schloeder, B, Kurtti, TJ, Munderloh UG. 2009.** Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari:Ixodidae). *J Med Entomo* 46: 625–632.

18. **Bayard-McNeeley M, Bansal A, Chowdhury I, Girao G, Small CB, Seiter K, Nelson J, Liveris D, Schwartz I, Mc Neeley DF, Wormser GP, Aguero-Rosenfeld ME. 2004.** In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Pathol* 57: 499-503.
19. **Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB. 2008.** Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(4): 455–464.
20. **Beaufils JP, Inokuma H, Granel JM, Jumelle P, Barbault M, Brouqui P. 2002.** *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Revue Méd Vet* 153(2): 85-90.
21. **Berzina I, Krudewig C, Silaghi C, Matise I, Ranka R, Müller N, Welle M. 2014.** *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs. *Ticks Tick-borne Dis* 5: 329-335.
22. **Bouzouraa T, René-Martellet M, Chene J, Charalampos A, Lebert I, Chavelt-Monfray K, Cadoré J, Halos L, Chabanne L. 2016.** Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dog in Mediterranean basin. *Ticks Tick-borne Dis* 7(6): 1256-1264.
23. **Bradfield JF, Vore SJ, PRYOR WH. 1996.** *Ehrlichia platys* infection in dogs. *Lab Anim Sci* 46 (5): 565-568.
24. **Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Qurollo BA, Saito TB, Maggi RG, Blanton LS, Bouyer DH. 2014.** Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit Vectors* 7: 298-304.
25. **Brown GK, Canfield PJ, Dustand RH, Roberts TK, Martin AR Brown CS, Irving R. 2006.** Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Aust Vet J* 84(9): 321-325.

26. **Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Aitken RJ. 2001.** Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet J 79(8): 554-558.
27. **Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Dunstan RH. 2005.** Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. Aust Vet J 83:101-102.
28. **Buitrago MI, Ijdo JW, Rinaudo P, Simon H, Copel J, Gadbaw J, Heimer R, Fikrig E, Bia FJ. 1998.** Human granulocytic ehrlichiosis during pregnancy treated successfully with rifampin. Clin Infect Dis 27(1): 213-215.
29. **Bustamante A. 1998.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* de la zona climática litoral de Lima Metropolitana en la estación de invierno. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 43p.
30. **Cardoso L, Gilad M, Cortes H, Nachum-Biala Y, Lopes AP, Vila-Viçosa MJ, Simões M, Rodrigues PA, Baneth G. 2015.** First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. Parasit Vectors 8: 144-151.
31. **Carballal P, Galliazi RA. 2015.** Ectoparásitos de carnívoros domésticos de importancia sanitaria en la ciudad Bella Unión, Uruguay. Tesis de Grado Doctor en Ciencias Veterinarias. Uruguay: Univ. De la República. 35p.
32. **Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. 2009.** Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. J Vet Intern Med 23: 1129-1141.
33. **Carvalho L, Armua-Fernandez MT, Sosa N, Félix ML, Venzal JM. 2017.** *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. Ticks Tick-borne Dis 8(2): 241-245.
34. **CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2019.** Clifton Road Atlanta: Anaplasmosis [Internet], [07 julio 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html>
35. **Cervantes MA. 2018.** Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*canis familiaris*) con ehrlichiosis en el distrito de Chiclayo, Lambayeque-Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 74p.

36. **Chang AC, Chang WL, Lin CT, Pan MJ, Lee SC. 1996.** Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci* 58: 473–476.
37. **Chang WL, Su WL, Pan MJ. 1997.** Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. *J Vet Med Sci* 59(9): 849-851.
38. **Chastagner A, Bailly X, Leblond A, Pradier S, Vourc'h G. 2013.** Single Genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from Ticks, Camargue, France. *Emerg Infect Dis* 19(5): 825-827.
39. **Chirek A, Silaghi C, Pfister K, Kohn B. 2018.** Granulocytic Anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. *J Small Anim Pract* 59: 112-120.
40. **Cicuttin GL, Brambati DF, Rodriguez JI, González C, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury FE, Jado I, Ando P. 2014a.** Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks Tick-borne Dis* 5(5): 484-488.
41. **Cicuttin GL, Vidal P, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury FE. 2014b.** Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Rev Chil Infect* 31(5): 563-568.
42. **Contreras ET, Dowers KL, Mooff S, Lappin M. 2018.** Clinical and laboratory effects of doxycycline and prednisolone in *Ixodes scapularis* – exposed dogs with chronic *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Top Companion Anim Med* 33(4): 147-149.
43. **Córdova LH. 2016.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en la Comunidad Jardines de Manchay en el distrito de Pachacamac. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Ricardo Palma. 36p.
44. **Dahmani M, Loudahi A, Mediannikov D, Fenollar F, Raoult D, Davoust B. 2015.** Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks Tick-borne Dis* 6: 198-203.
45. **Dale WE. 1977.** Índice-catálogo bibliográfico de las garrapatas (Ixodoidea) registradas en el Perú. *Rev Per Ent* 20: 100-102.

46. **Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. 2013.** Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit Vectors* 6: 213-229.
47. **Day MJ. 2016.** Arthropod – borne infectious diseases of the dog and cat. 2^a ed. EE:UU: CRC PRESS. 209p.
48. **De Arcangeli S, Balboni A, Serafini F, Battilani M, Dondi F. 2018.** *Anaplasma phagocytophilum* infection in thrombocytopenic dogs. *Vet Ital* 54: 73-78.
49. **De la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Vicente J, Estrada-Peña A, Almazán C, Kocan KM, Martín P, Gortázar C. 2004.** Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur J Wildl Res* 50: 187–196.
50. **De la Fuente J, Torina A, Naranjo V, Nicosia S, Alongi A, La Mantia F, Kocan KM. 2006.** Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res* 2: 24-28.
51. **De Tommasi AS, Baneth G, Breitschwerdt EB, Stanneck D, Dantas-Torres F, Otranto D, De Caprariis D. 2014.** *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. *J Clin Microbiol* 52(6): 2231–2234.
52. **Delgado NI, Montoya AG. 2018.** Influencia de la edad y el sexo sobre la prevalencia de *Anaplasma* spp. en caninos (*Canis familiaris*) atendidos en clínicas veterinarias en los distritos de José Leonardo Ortiz, La Victoria y Chiclayo. Julio - diciembre 2017. Tesis de Médico veterinario. Lambayeque: Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. 81p.
53. **Dhand A, Nadelman RB, Agüero-Rosenfeld M, Haddad FA, Stokes DP, Horowitz HW. 2007.** Human granulocytic anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clin Infect Dis* 45(5):589–593.
54. **Diniz P y Breitschwerdt E. 2012.** *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). En: Greene C. Infectious diseases of the dog and cat. 4^a ed. ELSEVIER. p 227-238.
55. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and

Anaplasmataceae in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145–2165.

56. **Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. 2005.** Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 11(12): 1828–1834.
57. **Dyachenko V, Pantchev N, Balzer HJ, Meyersen A, Straubinger RK. 2012.** First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasit Vectors* 5:49-55.
58. **Eberts MD, Vissotto PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. 2011.** Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *JAAHA* 47(6): 86-94.
59. **Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, Engvall EO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. 2000.** Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec* 146:186-190.
60. **Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013.** First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36(2): 169-173.
61. **Escalante JA. 1981.** Ectoparásitos de animales domésticos en el Cusco. *Rev Per Ent* 24: 123-125.
62. **Estares LA. 1999.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Lurigancho, San Martín de Porres, Comas e Independencia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 61p.
63. **Ferreira RF, Figueiredo A, Müller A, Matheus C, Garcia de Sá A, Abreu F, Luiz C, Pereira NR. 2007.** *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: Comparison between morphological and molecular tests. *Intern J Appl Res Vet Med* 5(3): 113-119.

64. **Foongladda S, Inthawong D, Kositanont U, Gaywee J. 2011.** *Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, and Bartonella* in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. Vector-borne and zoonotic diseases 11(10): 1335-1341.
65. **French TW, Harvey JW. 1983.** Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. Am J Vet Res 44 (12): 2407-2411.
66. **Gaunt S, Beall M, Stillman B, Lorentzen L, Diniz P, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. 2010.** Experimental infection and coinfection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit vectors 3: 33-42.
67. **Gaunt SD, Baker DC, Babin SS. 1990.** Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. Am J Vet Res 51(2): 290-293.
68. **Glaze MB, Gaunt SD. 1986.** Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. J Am Vet Med Assoc 189(8): 916-917.
69. **Glenny A, Mendoza U, Falconí R. 2004.** Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura y Amazonas. Rev Per Med Exp Salud Pública 20: 23-27.
70. **Goldstein RE, Eberts MD, Beall MJ, Thatcher B, Chandrashekar R, Alleman AR. 2014.** Performance comparison of SNAP®4Dx®Plus and AccuPlex®4 for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. Intern J Appl Res Vet Med 12(2): 141-147.
71. **Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR. 1940.** Studies on louping ill, tickborne fever and scrapie. In: Proceedings. 3rd International Congress of Microbiology. New York.
72. **Granick JL, Reneer DV, Carlyon JA, Borjesson DL. 2008.** *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. J Med Microbiol 57: 416-423.
73. **Greene CE. 2012.** Infectious Diseases of Dog and Cat. 4^a edition. EE.UU: Elsevier. 1354 p.

74. **Greig B, Armstrong PJ. 2006.** Canine granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In: Greene CE, ed. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St. Louis: Saunders. 219–24.
75. **Harrus S, Aroch I, Lavy E, Bark H. 1997.** Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec* 141 (10): 247-250.
76. **Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. 1978.** Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J Infect Dis* 137(2): 182-188.
77. **Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2005.** The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 106: 374-382.
78. **Hoskins JD, Breitschwerdt EB, Gaunt SD, French TW, Burgdorfer W. 1988.** Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. *J Vet Intern Med* 2: 55-59.
79. **Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. 2006.** Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLOS Genetics* 2: 211–216.
80. **Hua P, Yuhai M, Shide T, Yang S, Bohai W, Xiangrui. 2000.** Canine ehrlichiosis caused simultaneously of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. *Microbiol Immunol* 44 (9): 737-739.
81. **Huang H, Unver A, Perez MJ, Orellana NG, Rikihisa Y. 2005.** Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz J Microbiol* 36: 211-216.
82. **Huamán AM, Jara CA. 2017.** Ectoparásitos de *Canis familiaris*: Prevalencia de infestación en dos zonas de Trujillo, Perú. 2015. *REBIOL* 37: 19-24.

83. **IDEXX Laboratories. 2018.** España: Recursos y prospecto de la prueba Test SNAP® 4Dx® Plus. [Internet], [07 julio 2019], Disponible en: <https://www.idexx.es/files/snap-4dx-test-insert-en.pdf>
84. **Inokuma H, Fujii K, Matsumoto M, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M, Onishi T. 2002.** Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet Parasitol* 110(1): 145-152.
85. **Khatat SE, Daminet S, Kachani M, Leutenegger CM, Duchateau L, El Amri H, Hing M, Azrib R, Sahibi H. 2017.** *Anaplasma* spp. in dogs and owners in north-western Morocco. *Parasit Vectors* 10: 202-211.
86. **Khatat SE, Sahibi H, Hing M, Alaoui I, El Amri H, Benajiba M, Duchateaou L, Daminet S. 2016.** Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in two cities of Northwestern Morocco. *PLOS ONE* 11(8): 1-12.
87. **Kim CM, Kim MS, Park MS, Park HJ, Chae JS. 2003.** Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* Ticks from Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3:17-26.
88. **Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. 2008.** Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22(6): 1289–1295.
89. **Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. 2011.** Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 91: 71-76.
90. **Kontos VI, Papadopoulos O, French TW. 1991.** Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol* 20 (4): 101-108.
91. **Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, Mc Pherson JT, Mc Cormack JN. 1999.** Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 37(8): 2631-2638.
92. **Lasta CS, Santos AP, Messick JB, Oliveira ST, Biondo AW, Vieira RF, Dalmolin ML, González FHD. 2013.** Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 22(3): 360-366.

93. **Latrofa, MS, Dantas-Torres F, De Caprariis D, Cantacessi C, Capelli G, Lia RP, Breitschwerdt EB, Otranto D. 2016.** Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasit Vectors* 9: 269-274.
94. **Li H, Zheng YC, Ma L, Jia N, Jiang BG, Jiang RR, Huo QB, Wang YW, Liu HB, Chu YL, Song YD, Yao NN, Sun T, Zeng FY, Dumler JS, Jiang JF, Cao WC. 2015a.** Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. *Lancet Infect Dis* 15: 663–670.
95. **Liberato LW. 1998.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa El Salvador. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 31p.
96. **Lilliehook I, Egenvall A, Tvedten HW. 1998.** Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. *Vet Clin Pathol* 27: 116-122.
97. **Lin M, Rikihisa Y. 2003.** Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun* 71: 5324–5331.
98. **Little SE. 2010.** Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40: 1121-1140.
99. **McCown ME, Monterroso VH, Cardona W. 2015.** Monitoreo de Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi y Dirofilaria immitis en perros de tres ciudades en Colombia. *Rev CES Med Vet Zoot* 10(2): 224-231.
100. **Macieira DB, Messick JB, Cerqueira AM, Freire IM, Linhares GF, Almeida NK, Almosny NR. 2005.** Prevalence of Ehrlichia canis infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Clin Pathol* 34: 44-48.
101. **Madewell BR, Gribble DH. 1982.** Infection in two dogs with an agent resembling Ehrlichia equi. *J Am Vet Med Assoc* 180(5): 512–514.
102. **Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. 2013.** Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian. *Parasit Vectors* 6:103-112.

103. **Máttar S, Parra M. 2006.** Detection of antibodies to *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella* in rural inhabitants of the Caribbean area of Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 11(2): 781-789.
104. **Masgo DG. 2018.** Detección hematológica de *Anaplasma phagocytophilum* en caballos de la provincia de Chiclayo (Departamento Lambayeque – Perú). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 92p.
105. **Matei IA, Stuen S, Mordry D, Degan A, D’Amico G, Mihalca AD. 2017.** Neonatal *Anaplasma platys* infection in puppies: Further evidence for possible vertical transmission. *Vet J* 219: 40-41.
106. **Maurin M, Bakken JS, Dumler JS. 2003.** Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 413–415.
107. **McCown EM; Víctor H, Monterroso HV, Cardona W. 2015.** Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 10(2): 224-231.
108. **Moroff S, Sokolchik I, Woodring T, Woodruff C, Atkinson B, Lappin MR. 2014.** Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in dogs using an automated fluorescence based system. *Vet J* 202(2): 348-352.
109. **Motoi Y, Satoh H, Inokuma H, Kiyuuna T, Muramatsu Y, Ueno H, Morita C. 2001.** First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol* 45: 89-91.
110. **Naranjo H. 2018.** Frecuencia de Erliquiosis y Anaplasmosis en canes con historial de garrapatas en una Clínica Veterinaria particular en la provincia de Piura, Perú durante el periodo primavera- verano 2017/2018. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Peruana Cayetano Heredia. XP.
111. **Nelson RW, Couto CG. 2014.** Small animal internal medicine. 5ª ed. Canada: Elsevier. 1509 p.

112. **Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. 2010.** The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol* 26: 205–212.
113. **Nunton J, Quintana H, Vivar E. 2013.** Prevalencia de ectoparásitos y endoparásitos en *Canis familiaris* sacrificados en Tumbes; julio-diciembre, 2013. *Revista de Investigación Científica, Universidad Nacional de Tumbes*. 10(2):92-97.
114. **Oliva JM. 2015.** Determinación de Ehrlichiosis canina en la Ciudad de Chiclayo, mediante diagnóstico clínico y hematológico directo durante enero-octubre 2014. Tesis de Médico Veterinario. Lambayeque: Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. 72p.
115. **Palomar AM. 2017.** Papel de las aves en la dispersión de garrapatas y microorganismos que vehiculan. Tesis de Doctorado. Logroño: Univ. De La Roja. 167 p.
116. **Parola P, Cornet JP, Sanogo YO, Miller RS, Thien HV, Gonzalez JP, Raoult D, Telford SR, Wongsrichanalai C. 2003.** Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. *J Clin Microbiol* 41(4): 1600-1608.
117. **Peñaloza MA. 2015.** Diagnóstico de Dirofilariosis y Anaplasmosis canina en perros de los barrios rurales del Cantón Catamayo de la provincia de Loja a través del Test SNAP® 4Dx® canino. Tesis de Médica Veterinaria Zootecnista. Loja: Univ. Nac. de Loja. 78 p.
118. **Perez T. 2008.** Estudio de prevalencia de ectoparásitos en caninos hogareños en la zona norte del gran Buenos Aires. En: III Congreso Latinoamericano de zoonosis y VI Congreso argentino de zoonosis. Buenos Aires: Congreso de zoonosis.
119. **Pinyoowong D, Jittapalapong S, Suksawat F, Stich RW, Thamchaipenet A. 2008.** Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infect genet Evol* 8(4): 433-438.
120. **Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. 2009.** Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic Anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc* 45(5): 232–238.

121. **Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. 1998.** Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 47: 235–251.
122. **Pusterla N, Braun U, Wolfensberger C, Lutz H. 1997.** Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow. *Vet Rec* 141(4): 101–102.
123. **Quijada J, Forlano M, Bethencourt A, Gahón D, Gonzalez D, Vivas I. 2013.** Ectoparásitos (Acari: Ixodidae y Siphonaptera: Ctenocephalidae) en caninos bajo asistencia veterinaria en un hospital veterinario universitario de Venezuela. *Revista Científica, FVC- LUZ* 23(2): 105-110.
124. **Qurollo BA, Chandrashekar R, Hegarty BC, Beall MJ, Stillman BA, Liu J, Thatcher B, Pultorak E, Cerrito B, Walsh M, Breitschwerdt EB. 2014.** A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infect Ecol Epidemiol* 4: 24699.
125. **Ramos CA, Ramos RA, Araújo FR, Guedes DS, Souza II, Ono TM, Vieira A, Pimentel DS, Rosas EO, Faustino MA, Alves L. 2009.** Comparação de nested-PCR com o diagnóstico directo na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 58-62.
126. **Ramos RA, Latrofa MS, Giannelli A, Lacasella V, Campbell BE, Dantas-Torres F, Otranto D. 2014.** Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Vet Parasitol* 205: 285–288.
127. **Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. 1997.** Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J Infect Dis* 175: 210–213.
128. **Rubio MA, Salas EA, Gómez E. 2011.** Presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma* sp. en canes de la ciudad de Lima. *Rev Inv Vet* 22(3): 233-238.

129. **Sainz A, Amusategui I, Tesouro MA. 1999.** *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. J Vet Diagn Invest 11: 382-384.
130. **Sainz A, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. 2015.** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit Vectors 8:75-94.
131. **Santos F, Coppede JS, Pereira AL, Oliveira LP, Roberto PG, Benedetti RB, Zucoloto LB, Lucas F, Sbreira L, Marins M. 2009.** Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto Brazil Vet J 179: 145-148.
132. **Santos HA, Thomé SM, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, Vitari GL, Costa RL, Santos TM, Angelo IC, Santos LA, Faccini LJ, Massard CL. 2013.** Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. Parasit Vectors 6: 348- 357.
133. **Syke J, Foley J. 2014.** Bacterial diseases. In: Canine and Feline Infectious Diseases. California: ELSEVIER. p278-546.
134. **Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW. 1991.** Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. Am J Vet Res 52(9): 1537–1541.
135. **Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, Madrigal K, Hancock SI, Breitschwerdt EB. 2001.** Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. J Clin Microbiol 39: 90-93.
136. **Tateishi TV, Lí EO, Hoyos SL, Rivera GH, Manchego SA, Barrios AL, More BJ. 2005.** Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos compatible con Anaplasmosis. Rev Inv Vet 26: 111-118.
137. **Torina A, Blanda V, Antoci F, Scimeca S, D'Agostino R, Scariano E, Piazza A, Galluzzo P, Giudice E, Caracappa S. 2013.** A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. Transbound Emerg Dis 60(2): 125-130.

138. **Ullo CMD. 2018.** Incidencia de Anaplasmosis en caninos. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca: Univ. Politécnica Salesiana. 80p
139. **Ulutas B, Bayramli G, Karagenc T. 2007.** First case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infection in a dog in Turkey. J Vet Anim Sci 31(4): 279-282.
140. **Vargas G, Rogério M, Cendales DM, Carstens K, Gonçalves LR, Hoepfner MC, Zacarías R, Tinucci M. 2016.** Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. Braz J Vet Parasitol 25(4): 459-464.
141. **Warner T, Harrus S, Weiss DJ, Bark H, Keysary A. 1995.** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol 48:177-182
142. **Weinborn R, Zanelli M, López O, Pau N, Valdés F. 2018.** Anticuerpos anti-*Anaplasma* spp. en población de riesgo ocupacional de un hospital veterinario. Rev Inv Vet 29(2): 594-601.
143. **Woody BJ, Hoskins JD. 1991.** Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract 21:75–98.
144. **Woldehiwet Z. 2010.** The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 167: 108-122.
145. **Wong SJ, Thomas JA. 1998.** Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. J Clin Microbiol 36: 1959 – 1963.
146. **Yancey CB, Diniz PP, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Wiesen C, Qurollo BA. 2017.** Doxycycline treatment efficacy in dogs with naturally occurring *Anaplasma phagocytophilum* infection. J Small Anim Pract 59(5): 286-293.
147. **Zobba R, Anfossi AG, Visco S, Sotgiu F, Dedola C, Parpaglia ML, Battilani M, Pittau M, Alberti A. 2015.** Cell tropism and molecular epidemiology of *Anaplasma platys*-like strains in cats. Ticks Tick-borne Dis 6(3): 272-280.

IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN

“Hallazgos hematológicos y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)”

Este documento tiene como objeto solicitar la autorización escrita para la donación de una muestra de sangre de perro, con el fin de utilizarla en una investigación relacionada con la Anaplasmosis canina. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea precisa acerca de la misma

La toma de Muestra:

- Se colectarán muestras de sangre periférica de los perros en tubos con EDTA y tubos con gel separador. Para ello, se utilizará la vena cefálica como vaso de acceso.
- Los volúmenes a obtener serán de 3ml para el hallazgo hematológico y 5ml para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp.

El procesamiento de Muestra:

- Procesamiento del hallazgo hematológico:
Se preparará frotis de sangre periférica para evaluar la presencia de corpúsculos de inclusión (CI) y/o mórulas compatibles con *Anaplasma* spp. y alteraciones hematológicas compatibles con Anaplasmosis canina.
- Procesamiento serológico:
Detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. utilizando el Kit comercial Test SNAP® 4Dx® Plus.

Beneficios:

- Al propietario de la mascota se le brindará los resultados, vía correo electrónico o vía telefónica (de manera confidencial), sin algún costo adicional.

- Los resultados de la presente investigación ayudarán a mejorar la terapéutica de la Anaplasmosis canina, la frecuencia y distribución, así como diseñar mejores estrategias de prevención y control de la enfermedad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y Medicina veterinaria, en referencia a la investigación sobre “Hallazgos hematológicos y detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)”

DATOS DEL PROPIETARIO DE LA MASCOTA	
APELLIDOS	
NOMBRES	
DNI	
<p align="center"><i>Consiento voluntariamente participar en este estudio</i></p> <p align="center"><i>Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación</i></p>	
FIRMA	FECHA
	_____ de _____ del 2019
<p><i>Manifiesto que he recibido y entendido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.</i></p>	

Apéndice 2. Hemograma completo y hallazgo de CI o mórulas en los 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

C ¹	SE ²			ST ³	SL ⁴																		CD ⁵	
	GR	HTO	HB	P	GB	VALOR RELATIVO								VALOR ABSOLUTO										
						S	A	ME	MI	L	MO	E	B	S	A	ME	MI	LF	MO	E	B	P	L	
1	4'880,000	32	10.8	247,500	8,800	63	0	0	0	29	3	5	0	5,544	0	0	0	2,552	264	440	0		+	
2	4'190,000	28	9.2	30,000	8,200	54	6	1	0	31	2	6	0	4,428	492	82	0	2,542	164	492	0		+	
3	3'250,000	22	7.2	123,000	25,200	55	1	0	0	30	5	9	0	13,860	252	0	0	7,560	1,260	2,268	0		+	
4	5'140,000	34	11.3	145,500	16,250	82	0	0	0	8	4	6	0	13,325	0	0	0	1,300	650	975	0			
5	4'900,000	32	10.8	105,000	17,250	67	4	1	0	21	5	2	0	11,557.5	690	172.5	0	3622.5	862.5	345	0		+	
6	4'950,000	33	10.9	147,000	21,150	82	1	0	0	14	2	1	0	17,343	211.5	0	0	2,961	423	211.5	0			
7	6'980,000	46	15.4	202,500	15,800	45	1	0	0	41	4	9	0	7,110	158	0	0	6,478	632	1,422	0			
8	6'860,000	45	15.1	180,000	10,150	52	1	1	0	36	1	9	0	5,278	101.5	101.5	0	3,654	101.5	913.5	0		+	
9	4'430,000	29	9.8	217,500	9,150	60	0	0	0	35	1	4	0	5,490	0	0	0	3,202.5	91.5	366	0		+	
10	7'140,000	47	15.8	129,000	20,050	71	0	1	0	25	2	0	1	14,235.5	0	200.5	0	5,012.5	401	0	200.5	+	+	
11	6'590,000	44	14.5	180,000	11,300	56	3	2	0	30	2	5	2	6,328	339	226	0	3,390	226	565	226		+	
12	4'470,000	30	9.9	165,000	8,000	53	1	1	0	41	0	4	0	4,240	80	80	0	3,280	0	320	0		+	
13	6'320,000	42	14	192,000	9,300	75	0	0	0	17	3	5	0	6,975	0	0	0	1,581	279	465	0		+	
14	5'900,000	39	13	165,000	9,650	84	5	0	0	5	2	4	0	8,106	482.5	0	0	482.5	193	386	0			
15	6'190,000	41	13.7	262,500	8,550	54	1	0	0	31	7	7	0	4,617	85.5	0	0	2,650.5	598.5	598.5	0		+	
16	4'700,000	31	10.4	225,000	13,700	69	0	0	0	24	0	6	1	9,453	0	0	0	3,288	0	822	137			
17	9'270,000	61	20.5	210,000	12,000	60	0	0	0	31	3	6	0	7,200	0	0	0	3,720	360	720	0			
18	8'650,000	57	19.1	225,000	14,100	67	1	1	0	21	2	8	0	9,447	141	141	0	2,961	282	1,128	0			
19	9'030,000	60	19.9	145,000	10,000	59	2	0	0	31	2	6	0	5,900	200	0	0	3,100	200	600	0			
20	7'740,000	51	17.1	170,000	8,200	57	1	0	0	30	6	6	0	4,674	82	0	0	2,460	492	492	0			
21	5'910,000	39	13.0	105,000	13,300	32	0	0	0	62	0	6	0	4,256	0	0	0	8,246	0	798	0		+	

22	7'450,000	49	16.4	187,000	9,650	65	0	0	0	28	1	6	0	6,272.5	0	0	0	2,702	96.5	579	0	+
23	5'760,000	38	12.7	202,500	10,550	61	1	2	0	31	1	4	0	6,435.5	105.5	211	0	3,270.5	105.5	422	0	+
24	6'000,000	40	13.2	275,000	11,800	55	3	1	0	36	1	4	0	6,490	354	118	0	4,248	118	472	0	
25	5'680,000	38	12.5	355,000	4,500	85	3	0	0	9	1	2	0	3,825	135	0	0	405	45	90	0	
26	6'230,000	41	13.8	290,000	5,600	58	3	0	0	21	4	14	0	3,248	168	0	0	1,176	224	784	0	
27	8'140,000	54	18	120,000	8,350	72	0	1	0	24	1	2	0	6,012	0	83.5	0	2,004	83.5	167	0	
28	7'430,000	49	16.4	260,000	5,150	58	1	0	0	27	6	8	0	2,987	51.5	0	0	1,390.5	309	412	0	
29	6'200,000	41	13.7	180,000	10,000	75	2	0	0	16	5	2	0	7,500	200	0	0	1,600	500	200	0	+
30	7'390,000	49	16.3	205,500	8,150	49	0	0	0	38	3	10	0	3,993.5	0	0	0	3,097	244.5	815	0	
31	6'160,000	41	13.6	370,000	9,600	76	1	0	0	18	4	1	0	7,296	96	0	0	1,728	384	96	0	+
32	6'240,000	41	13.8	195,000	1,300	60	0	0	0	27	2	8	3	780	0	0	0	351	26	104	39	
33	4'830,000	32	10.7	165,000	5,400	84	3	1	0	10	1	0	0	4,536	162	54	0	540	54	0	0	
34	4'680,000	31	10.3	150,000	7,000	49	0	0	0	50	1	0	0	3,430	0	0	0	3,500	70	0	0	
35	4'700,000	31	10.4	205,000	12,900	32	3	0	0	64	0	1	0	4,128	387	0	0	8,256	0	129	0	+
36	5'420,000	36	12	75,000	15,900	75	1	0	0	18	5	1	0	11,925	159	0	0	2,862	795	159	0	
37	5'960,000	39	13.2	240,000	9,650	51	0	0	0	34	5	10	0	4,921.5	0	0	0	3,281	482.5	965	0	+
38	7'630,000	51	16.8	75,000	19,400	56	1	0	0	31	3	9	0	10,864	194	0	0	6,014	582	1,746	0	+
39	4'000,000	26	8.8	75,000	1,750	46	2	0	0	52	0	0	0	805	35	0	0	910	0	0	0	
40	6'010,000	40	13.3	225,000	9,900	79	3	0	0	10	1	7	0	7,821	297	0	0	990	99	693	0	
41	6'360,000	42	14	315,000	9,900	73	4	0	0	21	0	2	0	7,227	396	0	0	2,079	0	198	0	
42	5'120,000	34	11.3	240,000	7,850	56	2	2	0	40	0	0	0	4,396	157	157	0	3,140	0	0	0	+
43	4'670,000	31	10.3	210,000	13,350	61	5	0	0	26	2	6	0	8,143.5	667.5	0	0	3,471	267	801	0	+
44	5'000,000	33	11	225,000	12,450	86	3	0	0	9	0	2	0	10,707	373.5	0	0	1,120.5	0	249	0	+
45	6'520,000	43	14.4	165,000	13,150	60	2	0	0	31	4	3	0	7,890	263	0	0	4,076.5	526	394.5	0	+
46	6'640,000	44	14.7	139,500	7,400	70	1	0	0	19	5	5	0	5,180	74	0	0	1,406	370	370	0	+
47	4'210,000	28	9.3	186,000	8,550	69	2	0	0	17	4	8	0	5,899.5	171	0	0	1,453.5	342	684	0	
48	6'450,000	43	14.2	189,000	13,350	61	1	0	0	35	0	3	0	8,143.5	133.5	0	0	4,672.5	0	400.5	0	

49	7'720,000	51	17	180,000	13,050	51	1	0	0	38	0	7	0	6,655.5	130.5	0	0	4,959	0	913.5	0		
50	4'990,000	33	11	125,000	13,750	72	1	0	0	20	0	7	0	9,900	137.5	0	0	2,750	0	962.5	0		
51	4'960,000	33	10.9	156,000	9,050	43	1	0	0	51	1	4	0	3,891.5	90.5	0	0	4,615.5	90.5	362	0		
52	5'060,000	34	11.2	204,000	14,900	75	3	0	0	16	1	5	0	11,175	447	0	0	2,384	149	745	0		
53	6'930,000	46	15.3	79,000	5,300	50	0	0	0	47	2	1	0	2,650	0	0	0	2,491	106	53	0		
54	5'770,000	38	12.7	246,000	5,850	47	2	0	0	32	1	18	0	2,749.5	117	0	0	1,872	58.5	1,053	0		+
55	6'340,000	42	14	210,000	10,400	49	1	0	0	41	5	3	1	5,096	104	0	0	4,264	520	312	104		
56	7'050,000	47	15.6	186,000	10,700	60	0	0	0	25	6	8	1	6,420	0	0	0	2,675	642	856	107		
57	2'970,000	20	6.6	225,000	6,500	50	0	0	0	45	2	3	0	3,250	0	0	0	2,925	130	195	0		
58	5'740,000	38	12.7	247,500	6,950	57	2	0	0	31	6	4	0	3,961.5	139	0	0	2,154.5	417	278	0		
59	6'520,000	43	14.4	180,000	7,550	59	1	0	0	33	4	2	1	4,454.5	75.5	0	0	2,491.5	302	151	75.5		
60	4'410,000	29	9.7	375,000	8,750	40	1	0	0	57	0	2	0	3,500	87.5	0	0	4,987.5	0	175	0		
61	5'200,000	34	11.5	315,000	9,350	74	1	0	0	18	0	7	0	6,919	93.5	0	0	1,683	0	654.5	0		
62	6'000,000	40	13.2	265,500	9,650	47	3	0	0	31	5	14	0	4,535.5	289.5	0	0	2,991.5	482.5	1,351	0		
63	6'770,000	45	14.9	225,000	6,900	65	0	0	0	26	6	3	0	4,485	0	0	0	1,794	414	207	0		
64	6'620,000	44	14.6	180,000	4,850	45	1	0	0	49	0	4	1	2,182.5	48.5	0	0	2,376.5	0	194	48.5		
65	6'520,000	43	14.4	240,000	8,350	79	2	0	0	18	1	0	0	6,596.5	167	0	0	1,503	83.5	0	0		
66	6'890,000	46	15.2	277,500	13,400	74	1	0	0	22	0	3	0	9,916	134	0	0	2,948	0	402	0		
67	4'090,000	27	9	195,000	10,600	67	1	0	0	31	0	1	0	7,102	106	0	0	3,286	0	106	0		
68	6'259,000	41	13.8	232,500	7,900	76	4	0	0	17	0	3	0	6,004	316	0	0	1,343	0	237	0		
69	5'740,000	38	12.7	120,000	9,000	33	1	0	0	60	2	4	0	2,970	90	0	0	5,400	180	360	0		
70	4'450,000	29	9.8	210,000	11,600	66	2	0	0	23	0	9	0	7,656	232	0	0	2,668	0	1,044	0	+	+
71	3'840,000	25	8.5	210,000	8,100	24	1	0	0	69	4	2	0	1,944	81	0	0	5,589	324	162	0		+
72	4'220,000	28	9.3	195,000	5,000	37	2	0	0	57	3	1	0	1,850	100	0	0	2,850	150	50	0		
73	3'700,000	25	8.2	210,000	10,600	70	1	1	0	25	0	3	0	7,420	106	106	0	2,650	0	318	0		
74	7'210,000	48	15.9	240,000	12,850	36	1	0	0	58	3	2	0	4,626	128.5	0	0	7,453	385.5	257	0		+
75	4'540,000	30	10	210,000	13,600	61	1	0	0	30	0	8	0	8296	136	0	0	4,080	0	1,088	0		+

76	5'690,000	38	12.6	375,000	16,050	59	0	0	0	34	1	6	0	9,469.5	0	0	0	5,457	160.5	963	0		
77	6'520,000	43	14.4	255,000	11,650	78	0	0	0	16	0	6	0	9,087	0	0	0	1,864	0	699	0		
78	6'520,000	43	14.4	90,000	5,750	78	0	0	0	15	1	6	0	4,485	0	0	0	862.5	57.5	345	0		
79	6'780,000	45	15	105,500	8,500	75	0	1	0	18	0	6	0	6,375	0	85	0	1,530	0	510	0		
80	7'160,000	47	15.8	310,500	6,400	70	0	0	0	27	0	3	0	4,480	0	0	0	1,728	0	192	0		
81	5'160,000	34	11.4	225,000	8,650	47	0	0	0	44	0	9	0	4,065.5	0	0	0	3,806	0	778.5	0		
82	3'480,000	23	7.7	225,000	13,050	72	2	0	0	19	2	5	0	9,396	261	0	0	2,479.5	261	652.5	0		
83	4'500,000	30	9.9	336,000	9,250	60	3	0	0	30	0	7	0	5,550	277.5	0	0	2,775	0	647.5	0		
84	5'380,000	36	11.9	267,000	20,100	59	3	0	0	28	2	7	1	11,859	603	0	0	5,628	402	1,407	201		
85	5'590,000	37	12.3	180,000	11,850	78	1	0	0	19	1	1	0	9,243	118.5	0	0	2,251.5	118.5	118.5	0		
86	4'840,000	32	10.7	195,000	5,200	63	2	0	0	30	0	5	0	3,276	104	0	0	1,560	0	260	0		
87	6'900,000	46	15.2	120,000	8,600	52	1	0	0	41	0	6	0	4,472	86	0	0	3,526	0	516	0		
88	7'530,000	50	16.6	180,000	6,450	57	3	0	0	37	2	1	0	3,676.5	193.5	0	0	2,386.5	129	64,5	0		

¹ C = Número de código de perros

² SE = serie eritrocítica, GR = glóbulos rojos, HTO = hematocrito y HB = hemoglobina

³ ST = serie trombocítica y P = plaquetas

⁴ SL = serie leucocítica, S = segmentados, A = abastados, ME = metamielocitos, MI = mielocitos, L = linfocitos, MO = monocitos, E = eosinófilos y B = basófilos

⁵ CD = Célula diana, + es hallazgo de CI o mórula en frotis

Apéndice 3. Resultados de la serología en la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. en los 88 perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Chiclayo (Lambayeque - Perú)

C ¹	SEROLOGÍA ²	
	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Ehrlichia</i> spp.
1	-	-
2	-	+
3	-	-
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	-	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	-	+
12	+	+
13	-	+
14	-	+
15	-	+
16	-	+
17	-	+
18	-	+
19	+	+
20	-	+
21	-	+
22	-	+
23	-	+
24	-	-
25	-	+
26	-	+
27	-	+
28	-	-
29	-	+
30	-	+
31	-	+
32	-	-
33	-	-
34	-	+
35	-	+
36	-	+
37	-	+
38	+	+

39	-	+
40	-	+
41	-	-
42	-	+
43	-	+
44	-	-
45	-	-
46	+	+
47	+	+
48	-	-
49	-	+
50	-	+
51	-	+
52	-	-
53	-	+
54	+	+
55	-	-
56	-	-
57	-	-
58	-	+
59	-	+
60	-	-
61	+	+
62	-	-
63	-	+
64	-	-
65	-	-
66	-	-
67	-	+
68	-	+
69	+	+
70	+	+
71	+	+
72	-	+
73	-	+
74	-	+
75	+	+
76	-	-
77	-	-
78	-	+
79	-	-
80	-	-
81	-	+
82	+	+

83	-	-
84	+	+
85	+	+
86	+	-
87	+	+
88	-	-

¹ C = Número de código de perros

² + (seropositivo) y - (seronegativo)